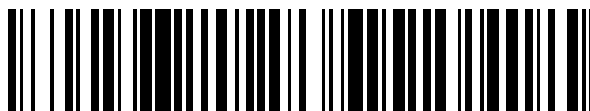


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 780**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C07K 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 10179820 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2351578**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de vacunas**

30 Prioridad:

27.06.2005 GB 0513069

27.06.2005 GB 0513071

28.07.2005 GB 0515556

28.11.2005 GB 0524204

21.12.2005 GB 0526040

21.12.2005 GB 0526041

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BIEMANS, RALPH LEON y
DUVIVIER, PIERRE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 621 780 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fabricación de vacunas

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para llevar a cabo reacciones de condensación de carbodiimida. En particular, se refiere a la conjugación de sacáridos y proteínas usando condensación de carbodiimida.

El uso de polisacáridos capsulares bacterianos se ha usado ampliamente en inmunología durante muchos años para la prevención de enfermedades bacterianas. Un problema con un uso tal, sin embargo, es la naturaleza T independiente de la respuesta inmune. Estos antígenos son muy poco inmunogénicos en niños pequeños. Este problema se ha superado por medio de la conjugación de los antígenos de polisacáridos a una proteína vehículo (una fuente de epítomos de linfocitos T ayudantes) que puede entonces utilizarse para provocar una respuesta inmune T dependiente, incluso en el primer año de vida.

En la técnica se conocen diversas técnicas de conjugación. Los conjugados pueden prepararse mediante procedimientos de aminación reductora directa como se describe en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). En los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508 se describen otros procedimientos. El procedimiento de conjugación puede depender alternativamente de la activación de los grupos hidroxilo del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. De esta manera el sacárido activado puede acoplarse directamente o a través de un grupo espaciador (conector) a un grupo amino en la proteína vehículo. Por ejemplo, el éster de cianato puede acoplarse con hexanodiamina o dihidrazida de ácido adípico (ADH o AH) y el sacárido derivado con un grupo amino se conjuga a la proteína vehículo usando química de la carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína vehículo. Tales conjugados se describen en la solicitud PCT publicada WO 93/15760 de la Universidad de Servicios Uniformados y en los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094. Véase también Chu C. y col. Infect. Immunity, 1983, 245-256.

En general, pueden usarse los siguientes tipos de grupos químicos en una proteína vehículo para acoplamiento / conjugación:

- A) Carboxilo (por ejemplo a través de ácido aspártico o ácido glutámico) que puede conjugarse a grupos amino naturales o derivatizados en restos sacárido por medio de química de la carbodiimida;
- B) Grupo amino (por ejemplo a través de lisina) que puede conjugarse a grupos carboxilo naturales o derivatizados en restos sacárido por medio de química de la carbodiimida;
- C) Sulfhidrilo (por ejemplo a través de cisteína);
- D) Grupo hidroxilo (por ejemplo a través de tirosina);
- E) Grupo imidazolilo (por ejemplo a través de histidina);
- F) Grupo guanidilo (por ejemplo a través de arginina); y
- G) Grupo indolilo (por ejemplo a través de triptófano).

En un sacárido, en general pueden utilizarse los siguientes grupos para un acoplamiento: OH, COOH o NH₂. Los grupos aldehído pueden generarse tras utilizar diferentes tratamientos conocidos en la técnica tales como: peryodato, hidrólisis ácida, peróxido de hidrógeno, etc.

Aproximaciones de acoplamiento directo:

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH₂-Prot → conjugado

Sacárido-aldehído + NH₂-Prot → base de Schiff + NaCNBH₃ → conjugado
 Sacárido-COOH + NH₂-Prot + EDAC → conjugado
 Sacárido-NH₂ + COOH-Prot + EDAC → conjugado

Aproximaciones de acoplamiento indirecto por medio de un espaciador (conector)

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH₂----NH₂ → sacárido----NH₂ + COOH-Prot + EDAC → conjugado

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH₂----SH → sacárido----SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida tras la modificación de grupos amino de la proteína por SPDP, por ejemplo) → sacárido-S-S-Prot

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH₂----SH → sacárido----SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) → conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂----NH₂ → sacárido-----NH₂ + EDAC + COOH-Prot → conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂----SH → sacárido----SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida tras la modificación de grupos amino de la proteína por SPDP, por ejemplo) → sacárido-S-S-Prot

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂----SH → sacárido----SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) → conjugado

Sacárido-aldehído + NH₂----NH₂ → sacárido---NH₂ + EDAC + COOH-Prot → conjugado

Como puede observarse la química de la carbodiimida (por ejemplo, utilizando EDAC) es muy conveniente para las reacciones de conjugación ya que hace uso de grupos en los sacáridos y/o proteínas que pueden estar presentes de manera natural o pueden insertarse fácilmente por derivatización. También une de manera conveniente restos a través de un enlace peptídico.

- 5 Las carbodiimidas (RN=C=NR') son compuestos insaturados con una estructura de aleno (Nakajima e Ikada, 1995, Bioconjugate Chem. 6: 123-130; Hoare y Koshland, 1967, JBC 242: 2447-2453). El compuesto químico es relativamente inestable a su pH de reacción (4,5-6,5), y por lo tanto en la técnica suelen añadirse todos los componentes de la reacción de conjugación de sacárido/proteína/carbodiimida juntos.

10 Los presentes inventores han encontrado que dependiendo de la naturaleza del sacárido y la proteína a conjugar, se pueden lograr mejores características del conjugado final para el uso en vacunas mediante la adición lenta de un componente determinado de la reacción a la mezcla. Al hacerlo pueden obtenerse uno o más beneficios/mejoras tales como: rendimiento del sacárido en el conjugado, capacidad de filtrado estéril del conjugado, mejor control de la conjugación, mayor facilidad de reproducibilidad, y/o prevención de la formación de enlaces de reticulación intra-resto.

15 Por consiguiente, en una realización se proporciona un procedimiento para conjugar un sacárido a una proteína vehículo mediante química de condensación de la carbodiimida, en el que el sacárido comprende (por ejemplo, como parte de su unidad de repetición), o se ha derivatizado para comprender, grupos amino y/o carboxilo, y en el que la proteína vehículo comprende, o se ha derivatizado para comprender, grupos amino y/o carboxilo, que comprende las etapas de:

20 I) - si la proteína vehículo comprende tanto grupos amino como carboxilo y el sacárido comprende grupos amino o bien carboxilo:

- a) mezclar el sacárido y la alícuota de carbodiimida necesaria para realizar la conjugación, y
- b) añadir la alícuota de proteína vehículo necesaria durante un período de 5 minutos a 6 horas;

25 II) - si el sacárido comprende tanto grupos amino como carboxilo y la proteína vehículo comprende grupos amino o bien carboxilo:

- a) mezclar la proteína vehículo y la alícuota de carbodiimida necesaria para realizar la conjugación, y
- b) añadir la alícuota de sacárido necesaria durante un período de 1 minuto a 6 horas;

30 III) - si el sacárido comprende tanto grupos amino como carboxilo y la proteína vehículo comprende tanto grupos amino como carboxilo:

- a) mezclar la proteína vehículo y el sacárido, y
- b) añadir la alícuota de carbodiimida necesaria para llevar a cabo la conjugación en un período de 1 minuto a 6 horas.

y en el que:

35 la alícuota de carbodiimida es de 0,01 a 3 mg de carbodiimida / mg de sacárido;
 el sacárido está presente en una concentración final de 0,5-50 mg/ml en la etapa b);
 la proteína vehículo está presente en una concentración final de 1-50 mg/ml en la etapa b);
 la relación inicial de proteína vehículo a sacárido es de 4:1 a 1:1 (p:p);
 el pH de la reacción en la etapa b) se mantiene a pH 4,5-6,5, o pH: 4,5-7,5 si en la etapa b) está presente un
 40 compuesto que mantiene el intermedio de reacción estable; y
 la temperatura de la reacción en la etapa b) se mantiene a 4-37 °C.

Descripción detallada

Puede utilizarse cualquier carbodiimida adecuada con la condición de que sea capaz de conjugar sacáridos y proteínas en un medio acuoso. En una realización, la carbodiimida puede ser EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) [también conocida como EDC] o puede ser una carbodiimida diferente de EDAC.

45 El término "sacárido" en toda la presente memoria descriptiva puede indicar polisacáridos u oligosacáridos e incluye ambos. Puede indicar lipopolisacárido (LPS) o lipooligosacárido (LOS). Antes de su uso, los polisacáridos (tales como los polisacáridos bacterianos) pueden aislarse de una cepa fuente (por ejemplo, de bacterias) o pueden aislarse a partir de la cepa fuente y se clasifican por tamaños en algún grado mediante procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, documentos EP 497524 y EP 497525; Shousun Chen Szu y col., Carbohydrate Research Vol.
 50 152, páginas 7-20 (1986)) por ejemplo por microfluidización. Los polisacáridos pueden clasificarse por tamaños para reducir la viscosidad en las muestras de polisacáridos y/o mejorar la capacidad de filtración de los productos conjugados. Los oligosacáridos tienen una serie baja de unidades de repetición (normalmente 5-30 unidades de repetición) y normalmente son polisacáridos hidrolizados.

El término “proteína vehículo” se refiere tanto a pequeños péptidos como a polipéptidos grandes (> 10 kDa). Los polipéptidos claramente grandes tienen más probabilidades de contener tanto grupos amino como carboxilo reactivos sin ninguna derivatización.

5 Para los fines de la presente invención, “polisacárido nativo” se refiere a un sacárido que no se ha sometido a ningún procedimiento, cuyo fin sea reducir el tamaño del sacárido. Se puede reducir ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos normales de purificación. Tales sacáridos son todavía nativos. Sólo si el polisacárido ha sido sometido a técnicas de alteración del tamaño, el mismo no será considerado nativo.

10 Para los fines de la presente invención “clasificado por tamaño por un factor de hasta x2” significa que el sacárido se somete a un procedimiento previsto para reducir el tamaño del sacárido pero para retener un tamaño superior a la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X3, x4, etc. se deben interpretar de la misma forma, es decir, el sacárido se somete a un procedimiento previsto para reducir el tamaño del sacárido, pero para retener un tamaño superior a un tercio, un cuarto, etc., del tamaño del polisacárido nativo.

15 El período de tiempo en la etapa b) del procedimiento para la adición de la alícuota completa del componente final puede ser de 1 minuto a 4 horas, de 2 minutos a 3 horas, de 3 minutos a 2 horas, de 4 a 60 minutos, de 5 a 50 minutos, de 6 a 40 minutos, de 7 a 30 minutos o de 8 a 20 minutos. Puede ser de 1 minuto a 5 horas, de 10 minutos a 4 horas, de 20 minutos a 3 horas, de 30 minutos a 2 horas, de 40 a 90 minutos, o de 50 a 70 minutos. Este tiempo puede ajustarse según el sacárido y la proteína específicos que se conjugan.

20 En una realización la alícuota del componente final (por ejemplo, de carbodiimida, sacárido o proteína) se añade a la mezcla de reacción a una velocidad constante durante el período de tiempo (esto se logra de manera conveniente mediante una bomba que funciona a una velocidad constante). Como alternativa, puede añadirse en etapas durante el período de tiempo. Aunque esto puede hacerse de muchas maneras, en general deben añadirse partes de la alícuota durante todo el período. Por ejemplo al menos un cuarto de la alícuota puede añadirse durante la primera mitad del período y al menos un cuarto de la alícuota en la segunda mitad del período. La cantidad total de la alícuota 'a' medida, por ejemplo, en ml o mg puede añadirse en 4-100 fases ('f') durante todo el período. En una realización, las etapas se organizan de tal modo que una cantidad exacta (a/f) se introduce en todas las fases. En una realización las fases son espaciadas uniformemente durante todo el período 'p' (en segundos). Por consiguiente, si una fase tiene lugar en el tiempo cero del período 'p', entonces cada etapa posterior tendrá lugar en un tiempo que es $p/(f-1)$. El volumen de la alícuota del componente final añadido en la etapa b) puede ajustarse en términos de facilidad de adición de la alícuota a la reacción en el plazo de tiempo deseado. La carbodiimida puede añadirse en forma de una solución acuosa (normalmente, tamponada a pH 7,5 antes de añadirse a la reacción) o como un polvo sólido (EDAC, por ejemplo, es muy soluble en medios acuosos). Por supuesto, si la carbodiimida es el último componente añadido a la reacción (situación III, etapa b)), puede utilizarse una carbodiimida de solución lenta, de manera que toda la alícuota de polvo se añade a la reacción a la vez, pero se disuelve a una velocidad coherente con el período deseado durante el cual la alícuota se pone a disposición de la reacción.

35 Si la proteína y/o el sacárido no tiene grupos amino o carboxilo (o sólo tiene uno de estos), los mismos pueden ser derivados para incorporarles uno (o para incorporarles el otro si aún no lo tienen). Por ejemplo, para un sacárido que sólo comprende grupos hidroxilo reactivos (por ejemplo, el sacárido capsular del meningococo serogrupo A), se debe utilizar tal grupo para derivarlo y convertirlo en grupos amino o carboxilo para que la condensación con EDAC pueda llevarse a cabo. Esto puede tener lugar dentro de una subunidad de repetición, o puede ser un grupo que sólo está presente al final de la molécula de sacárido.

40 Cabe señalar que cuando tiene lugar la derivatización, puede resultar beneficioso derivar sólo parcialmente el resto. Para sacáridos con subunidades de repetición, el epitopo diana puede estar presente en cada repetición. Por lo tanto, si tiene lugar la derivatización parcial (por esto se entiende que se derivatiza realmente el 0,5-20, el 1-15, el 3-12 o el 5-10 % de los grupos reactivos diana) ésta puede tener la ventaja de conservar la mayoría de los epítomos y evitar demasiada reticulación.

50 Si un sacárido o proteína ya tiene grupos amino o carboxilo únicamente (por ejemplo, el sacárido Vi de *Salmonella typhi* que naturalmente tiene grupos carboxilo pero no tiene grupos amino), la derivatización puede tener lugar para incorporarles el otro tipo de grupo (es decir, grupos amino para Vi). Debe señalarse, no obstante, que como la derivatización puede ser parcial, esta acción puede cambiar la reacción preferida de la invención de una tipo I a una tipo III. Por ejemplo, si se conjuga el sacárido Vi a una proteína vehículo que comprende tanto grupos amino como carboxilo, la situación I añade la alícuota de proteína lentamente en la etapa b). Si el grupo carboxilo del sacárido Vi se derivatiza parcialmente con grupos amino, tendrá tanto grupos carboxilo como amino, por consiguiente la situación III de añadir lentamente la alícuota de carbodiimida en la etapa b) pasa a ser más relevante.

55 La derivatización puede producirse mediante la adición de un conector hetero- u homo-bifuncional. Puede tener lugar con la química similar a la descrita anteriormente para la etapa de conjugación de sacárido y proteína (por ejemplo, química del CDAP o de la carbodiimida). El conector puede tener entre 4 y 20, 4 y 12, o 5 y 10 átomos de carbono. Puede tener dos grupos amino reactivos, dos grupos carboxilo reactivos, o uno de cada uno (por ejemplo, hexano diamina, ácido 6-aminocaproico o dihidrazida del ácido adípico). Normalmente, la derivatización tiene lugar a través de la reacción de un exceso del conector con el sacárido y/o la proteína vehículo a derivatizar. Esto permite

que la derivatización tenga lugar con mínima reticulación intra-resto (que de otro modo podría ser posible si por ejemplo la derivatización de un grupo carboxilo de un sacárido se estuviera llevando a cabo con grupos amino mediante condensación de la carbodiimida). El exceso de conector se retira fácilmente utilizando técnicas tales como la diafiltración.

- 5 En una realización, el sacárido comprende un grupo hidroxilo reactivo como parte de su unidad de repetición que se derivatiza parcialmente a través de un grupo amino del conector (por ejemplo, con la química del CDAP). En otra realización, el sacárido comprende un grupo reactivo amino como parte de su unidad de repetición que se derivatiza parcialmente a través de un grupo carboxilo del conector (por ejemplo, con la química de la carbodiimida). En una realización más, el sacárido comprende un grupo reactivo carboxilo como parte de su unidad de repetición que se derivatiza parcialmente a través de un grupo amino del conector (por ejemplo, con la química de la carbodiimida).

10 La alícuota de carbodiimida necesaria para realizar la conjugación (si está presente en la etapa a) o b) de la reacción de la invención) es de 0,01 a 3, de 0,05 a 2 o de 0,09 a 1 mg de carbodiimida/mg de sacárido. Aunque estos números se calcularon con respecto a EDAC siendo la carbodiimida, estos números pueden ajustarse si se utiliza cualquier otra carbodiimida multiplicando los números del intervalo por: (peso molecular de otra carbodiimida)/(peso molecular de EDAC).

15 El sacárido está presente en los procedimientos de la invención en una concentración final de 0,5-50 mg/ml en la etapa b). Esto dependerá del tamaño y de la naturaleza del sacárido, y del alcance de cualquier derivatización. Por ejemplo, para los oligosacáridos será necesaria una mayor concentración, pero para los polisacáridos grandes resultará más apropiada una concentración mucho menor. Si está presente hacia el extremo superior del parcialmente derivatizado con grupos amino o carboxilo, puede ser adecuada una concentración más pequeña para reducir la posibilidad de reticulación. La proteína vehículo está presente en una concentración final de 1-50 mg/ml en la etapa b).

20 La relación inicial de proteína vehículo a sacárido en los procedimientos de la invención es de 4:1 a 1:1 o de 3:1 a 2:1 (p/p). Nuevamente, esto dependerá del tamaño y de la naturaleza del sacárido y del alcance de cualquier derivatización.

25 Las condiciones de salinidad (por ejemplo, NaCl) también pueden variar de acuerdo con la naturaleza del sacárido y de la proteína. Por lo general, puede estar presente NaCl alrededor de 0,2 M en la etapa b) de los procedimientos de la invención, pero puede ser de 0-2, de 0,1-1 o de 0,2-0,5 M.

30 En términos de pH en la etapa b) de los procedimientos de la invención, el pH de la reacción puede ser pH de 4,5-6,5, 4,7-6,0 o 5-5,5. Este pH normalmente se mantiene a lo largo de la reacción por medio de la adición de ácido/base según sea necesario. EDAC es generalmente estable a pH 7,5, aunque si es necesario realizar la conjugación a compuestos de pH superiores, que se sabe que mantienen el intermedio de reacción estable (tal como N-hidroxisuccinimida), también puede estar presente en la reacción en la etapa b), en cuyo caso el pH de la reacción en la etapa b) se mantiene en un pH de 4,5-7,5.

35 La temperatura de reacción durante la etapa b) de los procedimientos de la invención es de 4-37, 10-32, 17-30 o 22-27 °C, y normalmente se mantiene a lo largo de la reacción.

40 En los procedimientos de la invención, una vez que se ha añadido toda la alícuota en la etapa b) la reacción se mantiene normalmente durante otros 10 minutos a 72 horas, 20 minutos a 48 horas, 30 minutos a 24 horas, 40 minutos a 12 horas, 50 minutos a 6 horas, o 1-3 horas. Una vez finalizada la reacción se ajusta el pH hasta 7,5-9 (hacia el extremo superior de este si está presente N-hidroxisuccinimida) para volver al intervalo de pH en el que es estable la carbodiimida.

45 Una vez conjugado, el conjugado de sacárido-proteína puede purificarse de: componentes sin reaccionar, sacáridos libres, etc. mediante la inyección del mismo en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, Sephacryl S400HR, Pharmacia). Esto se realiza normalmente a 2-8 °C. El conjugado puede filtrarse estéril y puede almacenarse. Finalmente, puede formularse una dosis eficaz (por ejemplo 1-20, 2-15 o 3-10 µg de sacárido/dosis) del conjugado de sacárido-proteína con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una sal o adyuvante) para la fabricación de una composición inmunogénica o vacuna.

50 En términos de los sacáridos de la invención, puede conjugarse cualquier sacárido de origen vírico, fúngico, bacteriano o eucariota por medio de los procedimientos de la invención. Puede ser el sacárido Vi de *Salmonella typhi*, o un sacárido diferente de Vi. Puede ser el sacárido capsular Hib de *H. influenzae* tipo b, o puede ser un sacárido diferente de Hib. En una realización, el sacárido es un sacárido capsular bacteriano, por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis* serogrupo (MenA), B (MenB), C (MenC), W135 (MenW) o Y (MenY), *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17, 18 C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F, Grupo B de *Streptococcus* grupos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI o VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi), *Vibrio cholerae* o *H. influenzae* tipo b.

5 El peso molecular promedio en peso del sacárido puede ser de 1000-2000000, 5000-1000000, 10000-500000, 50000-400000, 75000-300000 o 100000-200000. El peso molecular o peso molecular promedio de un sacárido en el presente documento se refiere al peso molecular promedio en peso (Mw) del sacárido medido antes de la conjugación y se mide por medio de MALLS. La técnica de MALLS es muy conocida en la técnica y se suele llevar a cabo como se describe en el ejemplo 2. Para los análisis por MALLS de sacáridos, se pueden usar dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl) en combinación y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan usando un detector de dispersión de luz (por ejemplo, Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo Wyatt Otilab DSP equipado con una célula P100 y un filtro rojo a 498 nm). En una realización, la polidispersidad del sacárido es de 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 o 1-1,05 y después de la conjugación a una proteína vehículo, la polidispersidad del conjugado es de 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 o 1,5-2,0. Todas las mediciones de polidispersidad se realizan por MALLS.

15 El sacárido puede ser o bien un polisacárido nativo o pueden haber sido clasificado por tamaño por un factor de no más de 2, 4, 6, 8, 10 o 20 veces (por ejemplo, por microfluidización [por ejemplo, por medio del aparato Emulsiflex C-50] u otra técnica conocida [por ejemplo por procedimientos de calor, químicos, de oxidación, de someter a ultrasonidos]). Los oligosacáridos pueden haber sido clasificados por tamaño considerablemente más [por ejemplo, por procedimientos conocidos de calor, químicos o de oxidación].

Se conocen las estructuras de la mayoría de estos sacáridos (y por lo tanto, si tienen naturalmente cualquier grupo amino o carboxilo para la química de la carbodiimida, o cualquier otro grupo reactivo que pueda ser derivado con grupos amino o carboxilo (véase la tabla a continuación).

	Grupo NH2 natural	Grupo COOH natural	Otro grupo reactivo
<i>S. aureus</i>			
PS5	No	Si	OH
PS8	No	Si	OH
<i>N. meningitidis</i>			
MenA	No	No	OH
MenC	No	Si	OH
MenW135	No	Si	OH
MenY	No	Si	OH
MenB	No (se puede generar por des-N-acetilación)	Si	OH / N-propilo
Grupo B de <i>Streptococcus</i>			
Ia, Ib	No	Si	OH
II	No	Si	OH
III	No	Si	OH
IV	No	Si	OH
V	No	Si	OH
VI	No	Si	OH
VII	No	Si	OH
<i>S. typhi</i>			
Vi	No	Si	No
<i>S. pneumoniae</i>			
PS1	Si	Si	OH
PS3, 4, 5, 8, 9, 12F	No	Si	OH
<i>Vibrio cholerae</i>			
Sacárido capsular	Si	No	OH
Hib de <i>H. influenzae B</i>	No	No	OH
LOS			
Nmen/ Mcat/ Hi	Si en PEA	Si en KDO	OH

El sacárido puede ser un lipooligosacárido o lipopolisacárido bacteriano (véase la tabla anterior), por ejemplo procedente de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli*, *Salmonella* o *M. catarrhalis*. El LOS puede ser de meningococo, del inmunitipo L2, L3 o L10. Se puede destoxificar por tratamiento alcalino de su resto lípidos A.

- 5 En una realización, el sacárido capsular MenA, está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una posición. La O-acetilación está presente por ejemplo al menos en la posición O-3 de al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición. En una realización, el sacárido capsular MenC, está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición NeuNAc unidas por ($\alpha 2 \rightarrow 9$) están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente por ejemplo en la posición O-7 y/o en O-8 de al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición. En una realización, el sacárido capsular MenW, está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente por ejemplo en la posición O-7 o en O-9 de al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición. En una realización, el sacárido capsular MenY, está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente en la posición 7 y/o 9 de al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición.
- 20 El porcentaje de O-acetilación se refiere al porcentaje de unidades de repetición que contienen O-acetilación. Esto puede medirse en el sacárido antes de la conjugación y/o después de la conjugación.

- La proteína vehículo puede ser cualquier péptido o proteína. Puede comprender uno o más epítopos de linfocitos T ayudantes. En una realización de la invención, la proteína vehículo se selecciona del grupo que consiste en: TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, proteína D de *H. influenzae*, PhtD del neumococo, y neumolisina del neumococo. Una proteína vehículo puede ser el toxoide del tétanos (TT), el fragmento C del toxoide del tétanos, mutantes no tóxicos del a toxina del tétanos [nótese que todas esas variantes de TT son consideradas el mismo tipo de proteína vehículo a los efectos de la presente invención], el toxoide de la difteria (DT), CRM 191, otros mutantes no tóxicos de la toxina de la difteria [tales como CRM 176, CRM 197, CRM 228, CRM 45 (Uchida y col. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM 102, CRM 103 y CRM 107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delecciones o mutaciones de la Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones dadas a conocer en el documento US 4709017 o US 4950740; la mutación de al menos uno o más residuos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones dadas a conocer en el documento US 5917017 o US 6455673; o un fragmento dado a conocer en el documento US 5843711] (nótese que todas esas variantes de DT son consideradas el mismo tipo de proteína vehículo a los efectos de la presente invención), la neumolisina de neumococo (Kuo y col. (1995) Infect Immun 63; 2706-2713), la OMPC (proteína de la membrana externa de meningococo - normalmente extraída del serogrupo B de *N. meningitidis* - documento EP 0372501), péptidos sintéticos (documentos EP 0378881, EP 0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668, EP 0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células T CD4+ humanas procedentes de antígenos derivados de diversos patógenos (Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) Infect Immun 72; 4884-4887), la proteína superficial de neumococo PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), proteína D de *H. influenzae* (documentos EP 594610 y WO 00/56360), PhtA del neumococo (WO 98/18930, también denominada Sp36), PhtD del neumococo (dada a conocer en el documento WO 00/37105, y también se denomina Sp036D), PhtB del neumococo (dada a conocer en el documento WO 00/37105, y también se denomina Sp036B) o PhtE (dada a conocer en el documento WO 00/30299 y se denomina BVH-3).

En un aspecto adicional divulgado se proporciona un conjugado de sacárido y proteína vehículo (o una composición inmunogénica o vacuna) obtenido o que puede obtenerse por el procedimiento de la invención.

- 50 Además se proporciona un uso de la composición inmunogénica o vacuna desveladas en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades y un procedimiento para prevenir o tratar la enfermedad que comprende la etapa de administrar una dosis eficaz de la composición inmunogénica o vacuna de la invención a un paciente que necesita la misma. El uso o el procedimiento pueden ser tales que la enfermedad esté causada por una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, Grupo B de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* y *H. influenzae*.

- Las composiciones inmunogénicas desveladas también pueden comprender una vacuna DTPa o DTPw (por ejemplo una que contiene DT, TT y una vacuna de células completas de pertussis (Pw) o una vacuna acelular de pertussis (Pa) (que comprende por ejemplo toxoide de pertussis, FHA, pertactina y, opcionalmente, aglutinógenos 2 y 3). Tales combinaciones también pueden comprender una vacuna contra la hepatitis B (por ejemplo puede comprender antígeno de superficie de la hepatitis b [HepB], opcionalmente adsorbido en fosfato de aluminio). En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende conjugados de sacáridos Hib, MenA y MenC, conjugados

de sacáridos Hib y MenC, o conjugados de sacáridos Hib, MenC y MenY, o conjugados de sacáridos MenA, MenC, MenW y MenY, en la que al menos uno, dos o todos los conjugados de sacáridos se generan según el procedimiento desvelado.

5 Las composiciones inmunogénicas desveladas comprenden opcionalmente antígenos víricos adicionales que confieren protección contra la enfermedad causada por el sarampión, las paperas y/o la rubeola y/o la varicela. Por ejemplo, la composición inmunogénica de la invención contiene antígenos de sarampión, paperas y rubéola (MMR) o de sarampión, paperas, rubéola y varicela (MMRV). En una realización, estos antígenos virales están presentes de manera opcional en el mismo recipiente que el conjugado o conjugados de sacáridos de meningococo y/o Hib presentes en la composición. En una realización, estos antígenos víricos están liofilizados.

10 La composición inmunogénica desvelada comprende además un antígeno de *N. meningitidis* serogrupo B. El antígeno es opcionalmente una preparación de vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* serogrupo b como se describe en los documentos EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 y WO 04/14419.

En general, la composición inmunogénica de la invención puede comprender una dosis de cada conjugado de sacárido de entre 0,1 y 20 µg, 2 y 10 µg, 2 y 6 µg o 4 y 7 µg de sacárido.

15 “En torno” o “aproximadamente” se definen como dentro del 10 % superior o inferior de la cifra dada, para los efectos de la invención.

En una realización, la composición inmunogénica se ajusta o se tampona a, o se ajusta a entre pH 7,0 y 8,0, pH 7,2 y 7,6 o aproximada o exactamente a pH 7,4.

20 La composición inmunogénica o vacunas opcionalmente se liofilizan en presencia de un agente estabilizante por ejemplo un poliol tal como sacarosa o trehalosa.

Opcionalmente, la composición inmunogénica o vacuna contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no están limitados a, sales de aluminio (fosfatos de aluminio o hidróxido de aluminio), mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de la pared celular de micobacterias, monofosforil lípido A, derivados del ácido micólico, tensioactivos de copolímeros en bloque no iónicos, Quil A, subunidad B de la toxina del cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos inmunoestimuladores (ISCOM) tales como los descritos por Takahashi y col. (1990) Nature 344: 873-875.

25 Para combinaciones de *N. meningitidis* o de HibMen, puede ser ventajoso no utilizar ningún adyuvante de sal de aluminio o ningún adyuvante en general.

30 Como ocurre con todas las composiciones inmunogénica o vacunas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos se deben determinar empíricamente. Los factores a considerar incluyen la inmunogenicidad, si el inmunógeno se complejará, o se unirá covalentemente a un adyuvante o proteína vehículo u otro vehículo, o no, la vía de administración y el número de dosificaciones inmunizadoras a administrar.

35 El agente activo puede estar presente en concentraciones variables en la composición farmacéutica o vacuna de la invención. Normalmente, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para conseguir su uso previsto, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución o suspendida de manera homogénea dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico es opcionalmente una que proporcionará una única dosificación terapéuticamente eficaz. Para sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para la bioactividad tras la reconstitución y la concentración máxima se encuentra en el punto en el que no se puede mantener una suspensión homogénea. En el caso de unidades de monodosis, la cantidad es la de una sola aplicación terapéutica. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 1-100 µg de antígeno de proteína, opcionalmente 5-50 µg o 5-25 µg. Por ejemplo, las dosis de sacáridos bacterianos son de 10-20 µg, 10-5 µg, 2,5-5 µg o 1-2,5 µg de sacárido en el conjugado.

45 Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano) susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de una vía sistémica o de mucosa. Un paciente humano es opcionalmente un bebé (menor de 12 meses de edad), un niño pequeño (de 12-24, 12-16 o 12-14 meses de edad), un niño (de 2-10, de 3-8 o de 3-5 años de edad), un adolescente (de 12-21, de 14-20 o de 15-19 años de edad) o un adulto. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración por una vía de mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Resulta de preferencia la administración por vía intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (puesto que se puede prevenir más eficazmente el transporte nasofaríngeo de neumococos, atenuando así la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar en forma de dosificación única, sus componentes también se pueden coadministrar juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, si los sacáridos están presentes en una vacuna, éstos se pueden administrar por separado al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de una vacuna de proteínas bacterianas para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias entre sí). Además de una sola vía de administración, se pueden usar dos vías de administración

diferentes. Por ejemplo, los antígenos virales se pueden administrar ID (por vía intradérmica), mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar IM (por vía intramuscular) o IN (por vía intranasal). Si están presentes los sacáridos, se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para primeras dosis e IN para dosis de refuerzo.

- 5 La preparación de vacuna se describe de manera general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). El encapsulamiento dentro de liposomas está descrito por Fullerton, Patente de EE.UU. N.º 4.235.877.

10 Un aspecto de la invención es un procedimiento para generar la composición inmunogénica o vacuna de la invención, que comprende la etapa de mezclar los sacáridos MenA y MenC de la invención producidos por el procedimiento de la invención, con MenW y MenY que no se han producido según la invención, y con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se ilustra en los ejemplos acompañantes. Los ejemplos siguientes se llevaron a cabo usando técnicas habituales, que son muy conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, excepto cuando se describa en detalle de otra manera. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

15 Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de conjugados de polisacáridos

Ejemplo 1a - Preparación de conjugado de polisacárido capsular de meningococo MenA y MenC de acuerdo con la invención

20 Los conjugados MenC-TT se produjeron usando polisacáridos nativos (de más de 150 kDa según la medición por medio de MALLS) o se microfluidizaron ligeramente. Los conjugados MenA-TT se produjeron usando polisacárido nativo o polisacárido ligeramente microfluidizado de más de 60 kDa según la medición por medio del procedimiento MALLS del ejemplo 2. La clasificación por tamaños fue por microfluidización usando un aparato homogenizador Emulsiflex C-50. A continuación los polisacáridos se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

25 Para conjugar el polisacárido capsular MenA al toxoide del tétanos a través de un espaciador, se usó el siguiente procedimiento. La unión covalente del polisacárido y el espaciador (ADH) se llevó a cabo mediante química de acoplamiento por la que el polisacárido se activa en condiciones controladas mediante un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de los grupos hidrazino, para formar un enlace isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

30 Se trató una solución de 10 mg/ml de MenA (pH 6,0) [3,5 g] con una solución de 100 mg/ml recién preparada de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una relación CDAP/MenA de 0,75 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se incrementó hasta pH 10,0. Tres minutos más tarde, se añadió ADH para obtener una relación de ADH/MenA de 8,9. El pH de la solución se redujo hasta 8,75 y la reacción prosiguió durante 2 horas manteniendo este pH (manteniendo la temperatura en 25 °C).

35 La solución PSA_{AH} se concentró hasta un cuarto de su volumen inicial y a continuación se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0,2 M usando una membrana Filtron Omega con un límite de filtración de 10 kDa, y se filtró el retenido.

Antes de la reacción de conjugación (condensación de la carbodiimida), la solución de TT purificada y la solución de PSA_{AH} se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml para el PSA_{AH} y 10 mg/ml para la TT.

40 Se añadió EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) a la solución de PSA_{AH} (2 g de sacárido) para alcanzar una relación final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSA_{AH}. El pH se ajustó a 5,0. El toxoide del tétanos purificado se añadió con una bomba peristáltica (en 60 minutos) hasta alcanzar los 2 mg de TT/mg de PSA_{AH}. La solución resultante se dejó 60 minutos a 25 °C en agitación para obtener un periodo de acoplamiento final de 120 minutos. La solución se neutralizó añadiendo Tris-HCl 1 M pH 7,5 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a +25 °C y a continuación durante la noche a una temperatura de +2 °C a +8 °C.

45 El conjugado se clarificó usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna de Sephacryl S400HR (Farmacia, Suecia). La columna se equilibró en Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), NaCl 0,075 M y el conjugado (aproximadamente 660 ml) se cargó en la columna (+2 °C a + 8 °C). La combinación de elución se seleccionó en función de la densidad óptica a 280 nm. La recogida comenzó cuando la absorbancia aumentó hasta 0,05. La recogida continuó hasta que Kd alcanzó el valor 0,30. El conjugado se esterilizó por filtración a +20 °C, a continuación se almacenó a una temperatura de +2 °C a +8 °C. El conjugado resultante tenía una relación de polisacárido:proteína de 1:2-1:4 (p/p).

50 Para conjugar el polisacárido capsular MenC al toxoide tetánico a través de un espaciador, se utilizó el siguiente procedimiento. La unión covalente del polisacárido y el separador (ADH) se llevó a cabo por una química de acoplamiento por la que se activó el polisacárido bajo condiciones controladas por medio de un agente de cianilación, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El espaciador reaccionó con el PS cianilado

a través de sus grupos hidrazino, formando un enlace de isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

Se trató una solución de 20 mg/ml de MenC (pH 6,0) (3,5 g) con una solución recién preparada de 100 mg/ml de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una relación de CDAP/MenC de 1,5 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se elevó hasta pH 10,0. En el pH de activación se añadió NaCl 5 M hasta lograr una concentración final de NaCl 2 M. Tres minutos más tarde, se añadió ADH para obtener una relación de ADH/MenC de 8,9. El pH de la solución se redujo hasta 8,75 y la reacción prosiguió durante 2 horas (mantenida a 25 °C).

La solución de PSC_{AH} se concentró hasta un mínimo de 150 ml y, a continuación, se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0,2 M utilizando una membrana Filtron Omega con un límite de filtración de 10 kDa y se filtró el retenido.

Antes de la reacción de conjugación, se diluyó la solución purificada de TT y la solución PSC_{AH} (escala de 2 g) en NaCl 0,2 M para llegar a una concentración de 15 mg/ml para PSC_{AH} y de 20 mg/ml para TT.

Se añadió el toxoide tetánico purificado a la solución de PSC_{AH} para llegar a 2 mg de TT/mg de PSC_{AH}. El pH se ajustó a 5,0. Se añadió EDAC (16,7 mg/ml en Tris 0,1 M, pH 7,5) con una bomba peristáltica (en 10 minutos) hasta llegar a una relación final de 0,5 mg de EDAC/mg de PSC_{AH}. La solución resultante se dejó durante 110 minutos a + 25 °C con agitación y regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 minutos. A continuación se neutralizó la solución por la adición de Tris-HCl 1 M, pH 9,0 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a + 25 °C y durante la noche a una temperatura de + 2 °C a + 8 °C. El conjugado se clarificó usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna de Sephacryl S400HR (Farmacia, Suecia). La columna se equilibró en Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), NaCl 0,075 M y el conjugado (aproximadamente 460 ml) se cargó en la columna (+2 °C a + 8 °C). La combinación de elución se seleccionó en función de la densidad óptica a 280 nm. La recogida comenzó cuando la absorbancia aumentó hasta 0,05. La recogida continuó hasta que Kd alcanzó el valor 0,20. El conjugado se esterilizó por filtración a +20 °C, a continuación se almacenó a una temperatura de +2 °C a +8 °C. El conjugado resultante tenía una relación de polisacárido:proteína de 1:2-1:4 (p/p)

Se realizaron diversos experimentos añadiendo EDAC durante 10-45 minutos - en todos los casos el resultado fueron conjugados de MenC de buena calidad. Sin embargo, si se añadía el vehículo de TT último y lentamente a la mezcla de MenC-ADH + EDAC se obtenía un gel - un conjugado que no podía ser purificado.

También se realizaron experimentos añadiendo la EDAC toda a la vez en la reacción pero la relación final de TT/PS (2,7/1) (p/p) del conjugado fue inferior a la del conjugado obtenido a través de la reacción en la que la EDAC se añadió durante 10 minutos (3,3/1); además, tanto la antigenicidad de αTT como la de αPS fue inferior a la medida en comparación con el conjugado obtenido por la reacción en la que la EDAC se añadió durante 10 minutos.

Nota sobre el % aproximado de derivatización de los polisacáridos

MenCAH: tras el tratamiento con CDAP y con ADH aproximadamente el 3,47 % de los grupos hidroxilo fueron derivados con ADH (con una estimación de dos grupos hidroxilo disponibles por subunidad de repetición). Para MenA: aproximadamente el 11,5 % de los grupos hidroxilo fueron derivados con ADH (considerando que sólo hay un grupo hidroxilo disponible por unidad de repetición).

Ejemplo 1b - preparación del conjugado de polisacárido capsular de neumococo PS 3

1) Procedimiento de PS03-TT_{AH}: PS03-TT_{AH}208

Clasificación por tamaños por medio de Emulsiflex

Se pesó el PS sobre la base de un contenido de humedad teórico del 10 %. Se disolvió el PS nativo durante la noche en NaCl 2 M a una concentración inicial de 3 mg/ml. Antes de la clasificación por tamaño, se clarificó la solución de PS nativo en un filtro con límite de filtración de 5 µm.

Se utilizó un aparato homogenizador EMULSIFLEX C-50 para reducir el peso molecular y la viscosidad del polisacárido antes de la etapa de activación. La eficiencia de la clasificación por tamaños depende de la presión del circuito, la presión de alimentación del émbolo y del número total de ciclos. A fin de mejorar la eficiencia de la clasificación por tamaños (y por consiguiente reducir el número total de ciclos), se sustituyó la celda de homogenización del Emulsiflex con una celda con una geometría fijada (Microfluidics F20Y- cámara de interacción de 0,75 µm). El objetivo de la clasificación por tamaños era reducir el peso molecular y la viscosidad del PS sin una disminución importante de su antigenicidad.

La reducción de tamaño se realizó a 408 ± 34 atm (6000 ± 500 psi) y se hizo el seguimiento intra procedimiento por medio de la medición de la viscosidad. La clasificación por tamaños se detuvo cuando se alcanzó el objetivo de $2,0 \pm 0,2$ cP.

Filtración del PS clasificado por tamaño en 0,22 µm

El PS clasificado por tamaño se filtró en una membrana Millipak (límite de filtración de 0,22 µm) a un caudal de 10 ml/min.

Derivatización de TT

5 La etapa de derivatización se realizó a 25 °C bajo agitación continua en un baño de agua de temperatura controlada. El TT se diluyó en NaCl 0,2 M para obtener una concentración final de TT de 25 mg/ml. Se añadió la ADH en forma sólida a la solución de TT hasta llegar a una concentración final de 0,2 M. Después de la solución completa de ADH, se ajustó el pH de la solución en pH 6,2 +/- 0,1 con HCl.

A continuación, se añadió EDAC a la solución de TT/ADH para llegar a una concentración final de 0,02 M. El pH se ajustó en 6,2 +/- 0,1 con HCl y se mantuvo bajo regulación del pH durante 1 hora.

Después de la etapa de derivatización, el pH se elevó hasta pH 9,5 con NaOH para detener la reacción. La solución se dejó durante 2 horas bajo regulación de pH antes de la etapa de diafiltración.

10 Diafiltración

El derivado TT_{AH} se diafiltró para eliminar la ADH sin reaccionar y los subproductos de EDAC. La diafiltración se realizó en una membrana Centramate (0,09 m², límite de filtración de 10 kDa). La solución se dializó contra 20 volúmenes de NaCl 0,2 M.

15 El seguimiento de la etapa de diafiltración se realizó por medio de una cuantificación de ADH (ensayo TNBS) en el permeado después de 5, 10, 15 y 20 volúmenes de diafiltración.

Filtración en 0,22 µm

El TT_{AH} finalmente se filtró en la membrana de límite de filtración de 0,22 µm (Millipack 40) a un caudal de 10 ml/min. A continuación el TT_{AH} filtrado se almacenó a -70 °C.

Conjugado de PS3-TT_{AH}

20 Las condiciones del procedimiento fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS3 de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una relación inicial de TT_{AH}/PS3 de 1,5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0,5 mg/mg PS y una concentración de TT de 10 mg/ml en NaCl 0,15 M.

25 Se diluyeron 50 mg de PS3 en NaCl 2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml. La solución purificada de TT_{AH} se diluyó en NaCl 0,2 M hasta llegar a una concentración de 10 mg/ml. Se ajustó el pH de la solución de PS3 a pH 5 con HCl.

30 Se añadió la EDAC en forma sólida a la solución de PS3 para llegar a una concentración final de 0,5 mg de EDAC/mg de PS. El pH se ajustó a 5,0 ± 0,05 con HCl y se añadió TT_{AH} manualmente en 11 minutos (alícuotas/min). La solución resultante se incubó durante 109 minutos a + 25 °C con agitación y regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 minutos. A continuación, se neutralizó la solución por medio de la adición de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se dejó 30 minutos a + 25 °C. Finalmente se clarificó el conjugado en una membrana de 5 µm y se inyectó en una columna de Sephacryl S400HR.

2) Procedimiento de PS03-TT_{AH} : PS03_{AH}-TT215**Clasificación por tamaños por de Emulsiflex**

Como anteriormente.

35 Filtración del PS clasificado por tamaño en 0,22 µm

Como anteriormente.

Derivatización de PS3

40 La etapa de derivatización se realizó a 25 °C bajo agitación continua en un baño de agua de temperatura controlada. Se diluyó el PS3 en NaCl 2 M para obtener una concentración final de PS de 3 mg/ml. La solución de PS se ajustó a pH 6,0 antes de la adición de CDAP (PS 0,25 mg/mg, solución a 100 mg/ml de una mezcla de acetonitrilo/WFI). El pH se aumentó a pH 9,5 con NaOH antes de la adición de ADH (8,9 mg de ADH/mg PS, solución a 100 mg/ml en NaCl 0,2 M). El pH se mantuvo en 9,5 y se reguló durante 60 minutos. El porcentaje de derivatización correspondió al 2,4 % (2,4 mg de ADH/100 mg de PS). Esto puede medirse con técnicas conocidas: TNBS para la estimación de ADH; y DMAB o resorcinol (Monsigny y col., (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530) para la cuantificación de PS. En este caso, la determinación de TNBS fue de 228 µg/ml y PS: 5250 µg/ml.

45 Dado que el Mw de ADH es de 174,2 y el Mw de la unidad de repetición de PS3 es 338,27 (con 1 grupo COOH y 4 grupos OH), hay 1,3 µmoles de ADH / 15,52 µmoles de unidad de repetición, o 1,3 µmoles de ADH / 62,08 µmoles de grupo reactivo hidroxilo. El 2,09 % de los grupos hidroxilo de PS3 eran grupos hidroxilo derivados con ADH.

Diafiltración

El derivado PS_{3AH} se diafiltró para eliminar la ADH sin reaccionar y los subproductos de CDAP. La diafiltración se realizó en una membrana UFP-30-C-H24LA (42 cm², límite de filtración de 30 kDa). La solución se dializó contra 20 volúmenes de NaCl 0,2 M.

- 5 El seguimiento de la etapa de diafiltración se realizó por medio de una cuantificación de ADH (ensayo TNBS) en el permeado después de 5, 10, 15 y 20 volúmenes de diafiltración.

Filtración en 0,22 µm

El PS_{3AH} finalmente se filtró en la membrana de límite de filtración 0,22 µm (Millipack 40) a un caudal de 10 ml/min. A continuación, el PS_{3AH} filtrado se almacenó a 4 °C.

10 Conjugado PS_{3AH}-TT

Las condiciones del procedimiento fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS₃ de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una relación inicial de TT/PS_{3AH} de 1,5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0,5 mg/mg de PS y una concentración de TT de 10 mg/ml en NaCl 0,15 M.

- 15 Se diluyeron 50 mg de PS_{3AH} en NaCl 0,2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml. La solución de TT purificada se diluyó en NaCl 0,2 M hasta llegar a una concentración de 10 mg/ml.

Se ajustó el pH de la solución de PS_{3AH} a pH 5 con HCl.

- 20 Se añadió la EDAC en forma sólida a la solución de PS_{3AH} para llegar a una concentración final de 0,5 mg de EDAC/mg de PS. El pH se ajustó a $5,0 \pm 0,05$ con HCl y se añadió la TT en 10 minutos usando una bomba peristáltica. La solución resultante se incubó durante 110 minutos a + 25 °C con agitación y regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 minutos. A continuación, se neutralizó la solución por medio de la adición de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se dejó 30 minutos a + 25 °C. Finalmente se clarificó el conjugado en una membrana de 5 µm y se inyectó en una columna de Sephacryl S400HR.

3) Procedimiento de PS_{03AH}-TT: PS_{3AH}-TT217

Clasificación por tamaños por de Emulsiflex

- 25 Como anteriormente.

Filtración del PS clasificado por tamaño en 0,22 µm

Como anteriormente.

Derivatización de PS3

Como para el conjugado 215.

30 Diafiltración

Como para el conjugado 215.

Filtración en 0,22 µm

Como para el conjugado 215.

Conjugado PS_{3AH}-TT

- 35 Las condiciones del procedimiento fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS₃ de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una relación inicial de TT/PS_{3AH} de 1,5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0,5 mg/mg de PS y una concentración de TT de 10 mg/ml en NaCl 0,15 M.

Se diluyeron 50 mg de PS_{3AH} en NaCl 0,2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml. La solución de TT purificada se diluyó en NaCl 0,2 M hasta llegar a una concentración de 10 mg/ml.

- 40 Se mezclaron las disoluciones de PS_{3AH} y TT y se ajustó el pH a 5 con HCl.

Se disolvió la EDAC en un tampón Tris 1 M, pH 7,5. Se añadieron 40 µl de EDAC cada minuto (10 minutos para llegar a la relación de EDAC/PS (0,5 mg de EDAC/mg de PS)). La solución resultante se incubó durante 110 minutos a + 25 °C bajo agitación y regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 minutos. A continuación, se neutralizó la solución por medio de la adición de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se dejó 30 minutos a + 25

°C. Finalmente, se clarificó el conjugado en una membrana de 5 µm y se inyectó en una columna de Sephacryl S400HR.

4) Procedimiento de PS03_{AH}-TT: PS3_{AH}-TT218

Clasificación por tamaños por Emulsiflex

5 Como anteriormente.

Filtración del PS clasificado por tamaño en 0,22 µm

Como anteriormente.

Derivatización de PS3

10 La etapa de derivatización se realizó a 25 °C bajo agitación continua en un baño de agua de temperatura controlada. Se diluyó el PS3 en NaCl 2 M para obtener una concentración final de PS de 3 mg/ml. Se añadió la EDAC en forma sólida hasta llegar a una relación de EDAC/PS de 0,1 mg/mg de PS. Tras completarse la solución, se ajustó el pH de la solución a 5. A continuación se añadió ADH (8,9 mg de ADH/mg PS, solución a 100 mg/ml en NaCl 0,2 M) usando una bomba peristáltica en 44 minutos (aunque de ese modo estaba presente un exceso de ADH, la adición directa también habría sido aceptable). El pH se mantuvo en 5,0 +/- 0,1 y se reguló durante 120 minutos (44' + 76'). La
15 reacción se detuvo al aumentar el pH hasta 7,5 usando hidróxido de sodio. El porcentaje de derivatización correspondió al 3,7 % (mg de ADH/mg de PS). La determinación de TNBS fue de 220 µg/ml y la determinación de PS fue de 5902 µg/ml, por consiguiente hay 1,26 µmoles de ADH / 17,44 µmoles de unidad de repetición (= µmoles de grupos reactivos COOH). Por consiguiente, el 7,22 % de los grupos carboxilo de PS3 eran grupos COOH modificados con ADH.

20 Diafiltración

El derivado PS3_{AH} se diafiltró para eliminar la ADH sin reaccionar y los subproductos de EDAC. La diafiltración se realizó en una membrana UFP-30-C-H24LA (42 cm², límite de filtración de 30 kDa). La solución se dializó contra 23 volúmenes de NaCl 0,2 M

25 El seguimiento de la etapa de diafiltración se realizó por medio de una cuantificación de ADH (ensayo TNBS) en el permeado después de 5, 10, 15 y 20 volúmenes de diafiltración.

Filtración en 0,22 µm

El PS_{AH} finalmente se filtró en la membrana de límite de filtración 0,22 µm (Millipack 40) a un caudal de 10 ml/min. A continuación, el PS3_{AH} filtrado se almacenó a 4 °C.

Conjugado PS3_{AH}-TT

30 Las condiciones del procedimiento fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS3_{AH} de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una relación inicial de TT/PS3_{AH} de 1,5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0,5 mg/mg de PS y una concentración de TT de 10 mg/ml en NaCl 0,15 M.

Se diluyeron 50 mg de PS3_{AH} en NaCl 0,2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml. La solución de TT purificada se diluyó en NaCl 0,2 M hasta llegar a una concentración de 10 mg/ml.

35 Se mezclaron juntas las disoluciones de PS3_{AH} y TT.

Se ajustó el pH a 5,0 ± 0,05 con HCl y se añadió la EDAC manualmente en 10 minutos (se añadieron alícuotas iguales cada minuto). La solución resultante se incubó durante 110 minutos a + 25 °C con agitación y regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 minutos. A continuación, se neutralizó la solución por medio de la adición de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se dejó 30 minutos a + 25 °C. Finalmente se clarificó el conjugado en una
40 membrana de 5 µm y se inyectó en una columna de Sephacryl S400HR.

Conclusiones:

Se produjeron diferentes conjugados mediante la química de la carbodiimida en la etapa de conjugación. El último componente añadido en la solución de reacción puede ser la proteína TT o el reactivo EDAC. El tiempo de adición puede tener un efecto sobre los conjugados resultantes.

45 **Conjugados PS3_{AH}TT215 y 217:**

Se utilizaron los mismos componentes y las mismas condiciones para preparar ambos conjugados. La forma en que se añadió el último componente fue diferente. El conjugado PS3_{AH}TT217 dio lugar a un producto que cumplió los criterios in vitro. Éste se preparó mediante la adición de EDAC en 10 minutos. El conjugado PS3_{AH}TT215, sin

embargo, no pudo ser filtrado en la membrana estéril. Para este, el último componente añadido en el medio de reacción fue la TT (en 10 minutos).

5 Las relaciones finales de TT/PS fueron muy diferentes para ambos conjugados. (0,98/1 frente a 0,50/1). Si se añade EDAC primero al PS_{AH} (teniendo ambos grupos reactivos amino y carboxilo), esto puede dar lugar a reticulación interna de los grupos carboxílico e hidrazina presentes en los polisacáridos, por consiguiente podría dar lugar a un conjugado más reticulado con una relación final más débil tras la adición de TT en 10 minutos.

Este efecto no se observa para el conjugado PS_{3AH}TT217. La incorporación de TT funcionó mejor mediante la adición de EDAC en 10 minutos, tal vez debido a la menor reticulación interna y a la mejor reticulación entre los grupos de hidrazina del PS_{3AH} y los grupos carboxílico de la proteína.

10 En el caso del conjugado 218, como la derivatización de PS₃ con EDAC sólo modifica parcialmente el polisacárido (para mantener la mayoría de los epítomos del polisacárido intactos), nuevamente están presentes ambos grupos reactivos, amino y carboxilo, es por ello que la adición lenta de EDAC en una etapa final de conjugación también es beneficiosa.

15 La lenta incorporación de TT en la etapa final de conjugación fue beneficiosa (sin embargo) para el conjugado 208 en el que la TT fue derivada por medio de ADH (y comprende grupos amino y carboxilo), mientras que el PS₃ se dejó con sus grupos reactivos-OH y -COOH nativos como parte de su subunidad de repetición. La adición de EDAC al PS₃ no tuvo el efecto de reticulación anterior, y la lenta incorporación de la TT derivada dio un conjugado con buenas características in vitro - véase a continuación.

Caracterización *in-vitro*:

Conj.	Derivatización/Química	Conjugación/Química	Adición del componente final
208	TT/ADH → EDAC	PS-TT _{AH} → EDAC	TT _{AH} añadido en 11 minutos
215	PS ₃ / ADH → CDAP	PS _{AH} -TT → EDAC	TT añadido en 10 minutos
217	PS ₃ / ADH → CDAP	PS _{AH} -TT → EDAC	EDAC añadido en 10 minutos
218	PS ₃ / ADH → EDAC	PS _{AH} -TT → EDAC	EDAC añadido en 10 minutos

20

Conj.	PS	[PS] (mg/ml)	[TT] (mg/ml)	Relación inicial TT/PS (p/p)	[EDAC] (mg/mg de PS)	Tiempo de acoplamiento (min)
208	C6302	2,0	10 (TT _{AH}), bomba	1,5/1	0,5/1	120
215	3 _{AH} 001 (CDAP)	2,0	10 bomba	1,5/1	0,5/1	120
217	3 _{AH} 001 (CDAP)	2,0	10	1,5/1	0,5/1 (Fracciones)	120
218	3 _{AH} 002 (CDAP)	2,0	10	1,5/1	0,5/1 (Fracciones)	120

Conj.	Relación final TT/PS (p/p)	Rendimiento de PS rec (%)	Rendimiento filtrado rec (%)	PS libre (%)	Antigenicidad αPS/aPS (%)	Antigenicidad αTT/aPS (%)
208	1,84/1	69	95	10,2	99	103 100*
215	0,50/1	17	27	-	-	-
217	0,98/1	66	100	0,7	17	103 100*
218	0,88/1	74	101	11,0	34	222 216*

* en comparación con el conjugado 208

Ejemplo 1c - preparación del conjugado de polisacárido Vi de *S. typhi* Vi de la invención

Clasificación por tamaños por Emulsiflex

25 Se pesó el PS sobre la base de un contenido de humedad teórico del 15 %. Se disolvió el PS nativo durante la noche en WFI a una concentración inicial de 7 mg/ml. Antes de la clasificación por tamaño, se clarificó la solución de PS nativo en un filtro con límite de filtración de 10 µm a un caudal de 50 ml/min.

Se utilizó un aparato homogenizador EMULSIFLEX C-50 para reducir el peso molecular y la viscosidad del polisacárido antes de la etapa de activación. La eficiencia de la clasificación por tamaños depende de la presión del circuito, la presión de alimentación del émbolo y del número total de ciclos. A fin de mejorar la eficiencia de la clasificación por tamaños (y por consiguiente reducir el número total de ciclos), se sustituyó la celda de homogenización del Emulsiflex con una celda con una geometría fijada (Microfluidics F20Y- cámara de interacción de 0,75 μm). El objetivo de la clasificación por tamaños era reducir el peso molecular y la viscosidad del PS sin una disminución importante de su antigenicidad.

La reducción de tamaño se realizó a $103,42 \pm 3,44$ MPa y se hizo el seguimiento intra procedimiento por medio de la medición de la viscosidad. La clasificación por tamaños se detuvo cuando se alcanzó el objetivo de $5,0 \pm 0,3$ cP.

10 **Filtración del PS clasificado por tamaño en 0,22 μm**

El PS clasificado por tamaño se filtró en una membrana Millipak 40 (límite de filtración de 0,22 μm) a un caudal de 10 ml/min. El PS clasificado por tamaño se almacenó a -20 °C.

Derivatización del polisacárido Vi

Se disolvieron 1,5 g de PS Vi clasificado por tamaño a 25 °C en EPI bajo agitación (5 mg/ml). Se añadieron 13,35 g de ADH (8,9 mg de ADH/mg de PS) a la solución de PS. Después de la solución completa, se ajustó el pH a $5,0 \pm 0,05$ con HCl 1N. Se añadió la EDAC (0,1 mg/mg de PS) en forma sólida. La solución se dejó 60 minutos a 25 °C. A continuación, se neutralizó la solución por medio de la adición de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se dejó al menos 30 minutos a 25 °C (como máximo 2 horas). Se estimó que el nivel de derivatización era del 4,55 % con la determinación de TNBS (mg de ADH/100 mg de PS). La determinación de TNBS fue de 200 $\mu\text{g/ml}$ y la determinación de PS fue de 4034 $\mu\text{g/ml}$; por consiguiente, 0,0697 μmoles de ADH/16,46 μmoles de unidad de repetición (Mw 245). 1,3 μmoles de ADH / 16,46 μmoles de grupo reactivo COOH en Vi, por consiguiente el 7 % de los grupos COOH de Vi eran grupos COOH derivados con ADH.

Diafiltración

El derivado PSVi_{AH} se diafiltró para eliminar la ADH sin reaccionar y los subproductos de EDAC. La diafiltración se realizó en una membrana Centramate (0,09 m², límite de filtración de 10 kDa). La solución se dializó contra 20 volúmenes de NaCl 0,2 M.

El seguimiento de la etapa de diafiltración se realizó por medio de una cuantificación de ADH (ensayo TNBS) en el permeado después de 3, 5, 10 y 20 volúmenes de diafiltración.

Filtración en 0,22 μm

30 El PSVi_{AH} finalmente se filtró en la membrana de límite de filtración 0,22 μm (Millipack 40) a un caudal de 10 ml/min. A continuación, el PSVi_{AH} filtrado se almacenó a $+2/+8$ °C durante un máximo de 4 días.

Conjugados PSVi_{AH}-TT

Las condiciones del procedimiento fueron las siguientes:

35 Una concentración inicial de PSVi_{AH} de 2 mg/ml en NaCl 0,2 M, una relación inicial de TT/PSVi_{AH} de 2,5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0,25 mg/mg de PS y una concentración de TT de 10 mg/ml en NaCl 0,2 M.

Se diluyó 1 g de PSVi_{AH} en NaCl 0,2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml (determinación por medio de ácido urónico). La solución de TT purificada se diluyó en NaCl 0,2 M hasta llegar a una concentración de 10 mg/ml.

40 Se añadió la TT a la solución de PSVi_{AH} para llegar a una relación final de 2,5 mg de TT / mg de PS. El pH se ajustó a $5,0 \pm 0,05$ con HCl 1N. La solución de EDAC (7,5 mg/ml en Tris 0,1 M, pH 7,5) se añadió a continuación (en 10 minutos con una bomba peristáltica) para llegar a 0,25 mg de EDAC/mg de PSVi_{AH}. La solución resultante se incubó durante 50 minutos a $+25$ °C con agitación y regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 60 minutos. A continuación, se neutralizó la solución por medio de la adición de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se dejó 30 minutos a $+25$ °C. El conjugado se transfirió a 4 °C y se dejó durante la noche bajo agitación continua lenta antes de la etapa de cromatografía.

Purificación

50 Antes a la elución en Sephacryl S400HR, el conjugado se clarificó por medio de un filtro Kleenpak de 10 μm . El caudal se fijó en 100 ml/min. A continuación, se inyectó el conjugado en la columna de Sephacryl S400HR y la combinación de recogida se basó en un valor de Kd. Se utilizó el siguiente criterio para la combinación de recogida: la recogida se inició desde una DO = 0,05 a 280 nm y terminó cuando Kd = 0,22.

Esterilización por filtración

Antes de la filtración, la mayor parte del producto se llevó nuevamente a temperatura ambiente. Posteriormente, el conjugado se filtró en una membrana de esterilización Opticap de 10,2 cm. El caudal se fijó en 30 ml/min.

Datos analíticos

- 5 El conjugado resultante tenía una relación final de TT/PS (p/p) de 2,44/1, un contenido de PS libre del 3,7 % y una antigenicidad de α PS/ α PS del 58 %

Ejemplo 1d - preparación de otros conjugados de polisacáridos

La unión covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) a TT se llevó a cabo mediante una química de acoplamiento desarrollada por Chu y col. (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). El polisacárido PRP de Hib se activó añadiendo CNBr e incubando a pH 10,5 durante 6 minutos. El pH se redujo hasta pH 8,75 y se añadió la dihidrazida del ácido adípico (ADH) y se prosiguió con la incubación durante 90 minutos más. El PRP activado se acopló al toxoide del tétanos purificado mediante la condensación con carbodiimida usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC). La EDAC se añadió al PRP activado hasta alcanzar una relación final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP activado. El pH se ajustó a 5,0 y se añadió al toxoide del tétanos purificado hasta alcanzar los 2 mg de TT/mg de PRP activado. La solución resultante se dejó durante tres días con agitación suave. Después de la filtración a través de una membrana de 0,45 μ m, el conjugado se purificó sobre una columna de Sephacryl S500HR (Farmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0,2 M.

Los conjugados MenC-TT se produjeron usando polisacáridos nativos (de más de 150 kDa según la medición por medio de MALLS) o se microfluidizaron ligeramente. Los conjugados MenA-TT se produjeron usando polisacárido nativo o polisacárido ligeramente microfluidizado de más de 60 kDa según la medición por medio del procedimiento MALLS del ejemplo 2. Los conjugados MenW y MenY-TT se produjeron usando polisacáridos clasificados por tamaño en torno a 100-200 kDa según la medición por medio de MALLS (véase ejemplo 2). La clasificación por tamaños fue por microfluidización usando un aparato homogenizador Emulsiflex C-50. A continuación los polisacáridos se filtraron a través de un filtro de 0,2 μ m.

La activación y el acoplamiento directo se llevaron a cabo como se describe en los documentos WO 96/29094 y WO 00/56360. Resumiendo, el polisacárido a una concentración de 10-20 mg/ml en NaCl 2 M a pH 5,5-6,0 se mezcló con una solución de CDAP (100 mg/ml recién preparada en acetonitrilo/WFI, 50/50) hasta una relación final de CDAP/polisacárido de 0,75/1 o 1,5/1. Después de 1,5 minutos, el pH se incrementó con hidróxido de sodio hasta pH 10,0. Después de tres minutos se añadió el toxoide del tétanos hasta alcanzar una relación de proteína/polisacárido de 1,5/1 para MenW, 1,2/1 para MenY, 1,5/1 para MenA o 1,5/1 para MenC. La reacción prosiguió durante una a dos horas.

Después de la etapa de acoplamiento, se añadió glicina hasta una relación final de glicina/PS (p/p) de 7,5/1 y el pH se ajustó a pH 9,0. La mezcla se dejó durante 30 minutos. El conjugado se clarificó usando un filtro Kleenpak de 10 μ m y a continuación se cargó sobre una columna de Sephacryl S400HR usando un tampón de elución de NaCl 150 mM o Tris 5 mM a pH 7,5. Los lotes clínicos se filtraron sobre una membrana de esterilización Opticap 4. Los conjugados resultantes tenían una relación promedio de polisacárido:proteína de 1:1-1:5 (p/p).

Ejemplo 2 - Determinación del peso molecular usando MALLS

Los detectores se acoplaron a una columna de HPLC de exclusión por tamaños desde la que se eluyeron las muestras. Por una parte, el detector de dispersión de luz láser midió las intensidades luminosas dispersadas en 16 ángulos por la solución macromolecular y por otra parte, un refractómetro interferométrico situado en línea permitió la determinación de la cantidad de muestra eluida. A partir de estas intensidades, se puede determinar el tamaño y la forma de las macromoléculas en solución.

El peso molecular promedio en peso (M_w) se define como la suma de los pesos de todas las especies multiplicado por sus respectivos pesos moleculares y dividido por la suma de pesos de todas las especies.

- 45 a) Peso molecular promedio en peso: $-M_w -$

$$M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

- b) Peso molecular promedio en número: $-M_n -$

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

c) Raíz cuadrada del radio medio: $-R_w$ - y R^2_w es el radio al cuadrado definido por:

$$(r^2)_w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

($-m_i$ - es la masa de un centro de dispersión i , y $-r_i$ - es la distancia entre el centro de dispersión i y el centro de gravedad de la macromolécula).

5 d) La polidispersidad se define como la relación $-M_w / M_n$ -.

Los polisacáridos de meningococos se analizaron por MALLS cargando en dos columnas de HPLC (TSKG6000 y 5000PWxl) usadas en combinación. Se cargaron 25 μ l de polisacáridos en la columna y se eluyó con 0,75 ml de agua filtrada. Los polisacáridos se detectaron usando un detector de dispersión de luz (Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (Wyatt Otilab DSP equipado con una célula P100 y un filtro rojo a 498 nm).

Las polidispersidades de pesos moleculares y las recuperaciones de todas las muestras se calcularon mediante el método de Debye usando un ajuste polinómico de orden 1 en el software Astra 4.72.

Ejemplo 3 - Ensayo clínico para evaluar el efecto de un conector en MenA en una vacuna de conjugado MenACWY

15 Se administró una única dosis de diferentes formulaciones de vacuna MenACWY a adolescentes de 15 a 19 años de edad en 5 grupos de 25 sujetos en una prueba aleatorizada 1:1:1:1:1. Las formulaciones ensayadas fueron:

F1 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico conteniendo el conjugado MenA un espaciador de AH (ADH) (preparado según el ejemplo 1) - 5/5/5/5 μ g

20 F2 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico conteniendo el conjugado MenA un espaciador de AH (preparado según el ejemplo 1) - 2,5/5/2,5/2,5 μ g

F3 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico conteniendo el conjugado MenA un espaciador de AH (preparado según el ejemplo 1) - 5/5/2,5/2,5 μ g

F4 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico sin ningún espaciador en ningún conjugado - 5/5/5/5 μ g grupo de control - ACWY Mencevax™

25 En el día 30 después de la inoculación, se extrajo una muestra de sangre de los pacientes.

Las muestras de sangre se utilizaron para calcular el porcentaje de pacientes con respuesta a los ensayos con suero bactericida ESB-MenA, ESB-MenC, ESB-MenW 135 y ESB-MenY un mes después de la dosis de la vacuna. Una respuesta a la vacuna se definió como: 1) para pacientes inicialmente seronegativos - un valor de anticuerpos posterior a la vacunación $\geq 1/32$ en 1 mes o 2) para pacientes inicialmente seropositivos - un valor de anticuerpos de ≥ 4 veces el valor de anticuerpos previo a la vacunación.

Resultados

35 Como se muestra en la siguiente tabla, el uso de un espaciador en el conjugado de MenA dio lugar a una mayor respuesta inmune contra MenA. El porcentaje de pacientes con respuesta pasó del 66 % al 90-95 % cuando se añadió el espaciador de AH. Esto se reflejó en un aumento en MGVS ESB (del inglés, SBA GMT) de 4335 a 10000 y un aumento de la media geométrica de la concentración MGC (del inglés, GMC) de 5 a 20-40. Sorprendentemente, el uso de un espaciador de AH también dio lugar a una mayor respuesta inmune contra MenC, según puede verse por un aumento en el porcentaje de pacientes con respuesta y un aumento de la MGVS ESB. También se pudo ver un aumento en la MGVS ESB contra MenY (6742-7122) y contra MenW (4621-5418) cuando se introdujo un espaciador.

Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenA %	MGV ESB-MenA	MGC anti-PSA μ g/ml ELISA
F1 5AH/5/5/5	90,9	9805	20,38
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	75	8517	29,5
F3 5AH/5/2,5/2,5	95,5	10290	47,83
F4 5/5/5/5	66,7	4335	5,46
Mencevax™	85,7	8022	27,39
Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenC %	MGV ESB-MenC	MGC anti-PSC μ g/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	69,6	3989	12,11
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	81,8	3524	12,78
F3 5AH/5/2,5/2,5	81,8	3608	8,4

(continuación)

Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenA %	MGV ESB-MenA	MGC anti-PSA µg/ml ELISA
F4 5/5/5/5	73,9	2391	8,84
Mencevax™	90,0	5447	38,71
Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenW %	MGV ESB-MenW	MGC anti-PSW µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	95	5418	9,65
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	85	4469	14,55
F3 5AH/5/2,5/2,5	95,5	4257	6,39
F4 5/5/5/5	95,5	4621	10,7
Mencevax™	86,4	2714	13,57
Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenW %	MGV ESB-MenW	MGC anti-PSY µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	91,3	7122	16,3
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	87,5	5755	12,52
F3 5AH/5/2,5/2,5	80	5928	8,88
F4 5/5/5/5	91,3	6742	13,88
Mencevax™	91,7	4854	21,02

Ejemplo 4 - Ensayo clínico para evaluar el efecto de un conector en conjugados MenA y MenC en una vacuna de conjugado MenACWY

5 Se administró una única dosis de diferentes formulaciones de vacuna MenACWY a adolescentes de 15 a 19 años de edad en 5 grupos de 25 sujetos en una prueba aleatorizada 1:1:1:1:1. Las formulaciones ensayadas fueron:

- 10 F1 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico conteniendo los conjugados MenA y MenC un espaciador de AH (preparado según el ejemplo 1) - 2,5/2,5/2,5/2,5 µg
- 10 F2 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico conteniendo los conjugados MenA y MenC un espaciador de AH (preparado según el ejemplo 1) - 5/5/2,5/2,5 µg
- 10 F3 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico conteniendo los conjugados MenA y MenC un espaciador de AH (preparado según el ejemplo 1) - 5/5/5/5 µg
- 10 F4 - MenACWY conjugada con toxoide tetánico conteniendo el conjugado MenA un espaciador de AH (preparado según el ejemplo 1) - 5/5/5/5 µg
- 15 Grupo de control - ACWY Mencevax™

En el día 30 después de la inoculación, se extrajo una muestra de sangre de los pacientes.

20 Las muestras de sangre se utilizaron para calcular el porcentaje de pacientes con respuesta a los ensayos con suero bactericida ESB-MenA, ESB-MenC, ESB-MenW 135 y ESB-MenY un mes después de la dosis de la vacuna. Una respuesta a la vacuna se definió como: 1) para pacientes inicialmente seronegativos - un valor de anticuerpos posterior a la vacunación $\geq 1/32$ en 1 mes o 2) para pacientes inicialmente seropositivos - un valor de anticuerpos de ≥ 4 veces el valor de anticuerpos previo a la vacunación.

Resultados

25 La introducción de un espaciador de AH en el conjugado MenC dio lugar a un aumento en la respuesta inmune contra MenC como se muestra en la siguiente tabla. Esto queda demostrado por un aumento en la MGV ESB de 1943 a 4329 y un aumento en la MGC de anti-PSC de 7,65 a 13,13. Se mantuvieron buenas respuestas inmunes contra MenA, MenW y MenY.

Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenA %	MGV ESB-MenA	MGC anti-PSA µg/ml ELISA
F1 2,5AH/2,5AH/2,5/2,5	75	8417	20,23
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	72	6299	16,07
F3 5AH/5AH/5/5	87	9264	27,26
F4 5AH/5/5/5	77,3	9632	20,39
Mencevax™	78,3	8284	12,93

ES 2 621 780 T3

(continuación)

Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenC %	MGV ESB-MenC	MGC anti-PSC µg/ml ELISA
F1 2,5AH/2,5AH/2,5/2,5	88	3619	12,82
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	88	2833	13,32
F3 5AH/5AH/5/5	95,8	4329	13,13
F4 5AH/5/5/5	95,8	1943	7,65
Mencevax™	91,7	1567	16,55
Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenC %	MGV ESB-MenC	MGC anti-PSW µg/ml ELISA
F1 2,5AH/2,5AH/2,5/2,5	100	5656	7
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	96	4679	5,4
F3 5AH/5AH/5/5	91,3	4422	4,45
F4 5AH/5/5/5	88	4947	7,67
Mencevax™	96	3486	11,93
Formulación	Pacientes con respuesta a ESB MenY %	MGV ESB-MenY	MGC anti-PSY µg/ml ELISA
F1 2,5AH/2,5AH/2,5/2,5	75	3891	17,81
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	92	3968	11,96
F3 5AH/5AH/5/5	79,2	2756	9,51
F4 5AH/5/5/5	80	3914	16,76
Mencevax™	88	3056	21,41

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para conjugar un sacárido a una proteína vehículo mediante química de condensación de la carbodiimida, en el que el sacárido comprende (por ejemplo, como parte de su unidad de repetición), o se ha derivatizado para comprender, grupos amino y/o carboxilo, y en el que la proteína vehículo comprende, o se ha derivatizado para comprender, grupos amino y/o carboxilo, que comprende las etapas de:
- 5 I) - si la proteína vehículo comprende tanto grupos amino como carboxilo y el sacárido comprende bien grupos amino o bien carboxilo:
- a) mezclar el sacárido y la alícuota de carbodiimida necesaria para llevar a cabo la conjugación, y
 b) añadir la alícuota de proteína vehículo necesaria durante un período de 5 minutos a 6 horas, en el que al menos un cuarto de la alícuota se añade durante la primera mitad del período y al menos un cuarto de la alícuota en la segunda mitad del período;
- 10 II) - si el sacárido comprende tanto grupos amino como carboxilo y la proteína vehículo comprende bien grupos amino o bien carboxilo:
- a) mezclar la proteína vehículo y la alícuota de carbodiimida requerida para llevar a cabo la conjugación, y
 b) añadir la alícuota de sacárido necesaria durante un período de 1 minuto a 6 horas, en el que al menos un cuarto de la alícuota se añade durante la primera mitad del período y al menos un cuarto de la alícuota en la segunda mitad del período;
- 15 III) - si el sacárido comprende tanto grupos amino como carboxilo y la proteína vehículo comprende tanto grupos amino como carboxilo:
- a) mezclar la proteína vehículo y el sacárido, y
 b) añadir la alícuota de carbodiimida necesaria para llevar a cabo la conjugación en un período de 1 minuto a 6 horas, en el que al menos un cuarto de la alícuota se añade durante la primera mitad del período y al menos un cuarto de la alícuota en la segunda mitad del período;
- 20 y en el que:
- la alícuota de carbodiimida es de 0,01 a 3 mg de carbodiimida / mg de sacárido;
 el sacárido está presente en una concentración final de 0,5-50 mg/ml en la etapa b);
 la proteína vehículo está presente en una concentración final de 1-50 mg/ml en la etapa b);
 la relación inicial de proteína vehículo a sacárido es de 4:1 a 1:1 (p:p);
- 25 el pH de la reacción en la etapa b) se mantiene a pH: 4,5-6,5, o pH: 4,5-7,5 si en la etapa b) está presente un compuesto que mantiene el intermedio de reacción estable; y
 la temperatura de la reacción en la etapa b) se mantiene a 4-37 °C.
- 30 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la etapa b) el período es de 1 minuto a 4 horas, de 2 minutos a 3 horas, de 3 minutos a 2 horas, de 4 a 60 minutos, de 5 a 50 minutos, de 6 a 40 minutos, de 7 a 30 minutos o de 8 a 20 minutos.
- 35 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la carbodiimida es EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida).
4. El procedimiento de las reivindicaciones 1-3, en el que el sacárido y/o la proteína vehículo se han derivatizado para comprender grupos amino o carboxilo.
- 40 5. El procedimiento de las reivindicaciones 1-4, que comprende una etapa c) posterior, en la que el conjugado de sacárido-proteína se purifica en una columna de cromatografía de exclusión por tamaños.
6. El procedimiento de las reivindicaciones 1-5, que comprende una etapa d) posterior, en la que el conjugado de sacárido-proteína se esteriliza por filtración.
- 45 7. El procedimiento de las reivindicaciones 1-6, en el que el sacárido es un sacárido capsular bacteriano, por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis* serogrupos A, B, C, W135 o Y, *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F, Grupo B de *Streptococcus* grupos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI o VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi), *Vibrio cholerae* o *H. influenzae* tipo b.
- 50 8. El procedimiento de las reivindicaciones 1-6, en el que el sacárido es un lipooligosacárido o lipopolisacárido bacteriano, por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli*, *Salmonella* o *M. catarrhalis*.

9. El procedimiento de las reivindicaciones 1-8, en el que la proteína vehículo comprende uno o más epítopos de linfocitos T ayudantes.

5 10. El procedimiento de las reivindicaciones 1-9, en el que la proteína vehículo se selecciona del grupo que consiste en: TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, proteína D de *H. influenzae*, PhtD del neumococo y neumolisina del neumococo.

10 11. Un conjugado sacárido-proteína vehículo obtenible por el procedimiento de las reivindicaciones 1-10, en el que el sacárido es un sacárido capsular bacteriano, por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis* serogrupo A, B, C, W135 o Y, *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F, Grupo B de *Streptococcus* grupos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI o VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi) o *Vibrio cholerae*, o en el que el sacárido es un lipooligosacárido o lipopolisacárido bacteriano, por ejemplo derivada de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli*, *Salmonella* o *M. catarrhalis*.