

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 050**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/64** (2007.01)

**A61K 39/085** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2007 PCT/EP2007/053060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2007 WO07113224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2007 E 07727532 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2026841**

54 Título: **Procedimiento de conjugación para PNAG y una proteína transportadora**

30 Prioridad:

**30.03.2006 US 787587 P**

**30.03.2006 GB 0606416**

**30.03.2006 GB 0606417**

**30.03.2006 US 787249 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.03.2018**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)  
RUE DE L'INSTITUT, 89  
1330 RIXENSART, BE y  
THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BIEMANS, RALPH LEON;  
DUVIVIER, PIERRE y  
MAIRA-LITRAN, TOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 659 050 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de conjugación para PNAG y una proteína transportadora

La presente invención se refiere al campo de la conjugación y proporciona un procedimiento para la conjugación de PNAG a una proteína transportadora, como se define en las reivindicaciones. El conjugado de PNAG-proteína transportadora se puede formular adicionalmente para proporcionar una vacuna. La invención también engloba un conjugado de PNAG-proteína transportadora, una vacuna que comprende un conjugado de PNAG-proteína transportadora y su uso en terapia.

El número de infecciones extrahospitalarias e intrahospitalarias se ha incrementado en los últimos años con el aumento del uso de dispositivos intravasculares. Las infecciones extrahospitalarias (nosocomiales) son una causa importante de morbilidad y mortalidad, más particularmente en los Estados Unidos, donde afectan a más de 2 millones de pacientes al año. De acuerdo con diversos estudios, aproximadamente el 6 por ciento de los pacientes de Estados Unidos adquirirá una infección durante su estancia en el hospital. Se ha estimado que la carga económica en los Estados Unidos fue superior a 4500 millones de dólares en 1992 (Emori y Gaynes, 1993, Clin. Microbiol. Rev. 6; 428). Las infecciones más frecuentes son las infecciones del tracto urinario (ITU - 33 % de las infecciones), seguido de neumonía (15,5 %), infecciones de la zona quirúrgica (14,8 %) e infecciones primarias del torrente sanguíneo (13 %) (Emori y Gaynes, 1993, Clin. Microbiol. Rev. 6; 428). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococci* coagulasa-negativos (mayoritariamente *Staphylococcus epidermidis*), *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son los principales patógenos nosocomiales. Aunque esos patógenos prácticamente provocan el mismo número de infecciones, la gravedad de los trastornos que pueden producir combinada con la frecuencia de cepas aisladas resistentes a antibióticos equilibra esta clasificación hacia *S. aureus* y *S. epidermidis* como los patógenos nosocomiales más significativos.

*Staphylococcus aureus* es la causa más común de infecciones nosocomiales con una morbilidad y mortalidad significativas (Romero-Vivas y col., 1995, Infect. Dis. 21; 1417). Es la causa de algunos casos de osteomielitis, endocarditis, artritis séptica, neumonía, abscesos y síndrome de choque tóxico.

*S. epidermidis* es un comensal normal de la piel que además es un patógeno oportunista importante responsable de infecciones en dispositivos médicos implantados e infecciones en las zonas quirúrgicas. Los dispositivos médicos infectados por *S. epidermidis* incluyen marcapasos cardíacos, derivaciones del líquido cefalorraquídeo, catéteres de diálisis peritoneal continua ambulatoria, dispositivos ortopédicos y válvulas cardíacas prostéticas.

Las infecciones por *S. aureus* y *S. epidermidis* se tratan con antibióticos, siendo la penicilina el fármaco preferido mientras que la vancomicina se usa para cepas aisladas resistentes a la metilicina. El porcentaje de cepas estafilocócicas que presentan una resistencia de amplio espectro a antibióticos se ha vuelto cada vez más frecuente desde los años 80 (Panlilo y col., 1992, Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 13; 582), representando una amenaza para una terapia antimicrobiana eficaz. Además, la reciente aparición de una cepa de *S. aureus* resistente a la vancomicina ha despertado el temor a que aparezcan y se extiendan cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina, para las cuales no hay disponible una terapia eficaz.

Se ha investigado una estrategia alternativa del uso de anticuerpos contra antígenos estafilocócicos en inmunoterapia pasiva. Está en desarrollo una terapia que supone la administración de antisuero policlonal (documentos WO 00/15238, WO 00/12132) así como el tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra el ácido lipoteicoico (documento WO 98/57994).

Una estrategia alternativa sería el uso de la vacunación activa para generar una respuesta inmunitaria contra estafilococos. Se han identificado varios candidatos para su inclusión como componentes de la vacuna. Éstos incluyen glucosamina poli-N-acetilada (PNAG), que es un polisacárido de superficie que se encuentra en estafilococos, por ejemplo, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Particularmente cuando este antígeno está en forma desacetilada (dPNAG), se ha demostrado que genera una respuesta inmunitaria opsónica (documento WO 04/43405). El documento WO 04/43405 ha desvelado la conjugación de PNAG a una proteína transportadora usando el agente cianilante orgánico tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) y la conjugación de dPNAG a una proteína transportadora mediante la activación de la proteína transportadora con glutaraldehído, seguido de aminación reductora. El documento WO 03/53462 desvela un exopolisacárido de *S. aureus* y un procedimiento para su aislamiento y conjugación.

La conjugación con CDAP descrita no es apropiada para su uso con dPNAG debido a que la dPNAG activada puede reaccionar con grupos NH<sub>2</sub> en dPNAG, de manera que existe el riesgo de reticular la dPNAG si se usa la química del CDAP. El procedimiento descrito para la conjugación de dPNAG tiene la desventaja del uso del tratamiento con glutaraldehído como primera etapa para introducir grupos aldehído en la proteína transportadora. El tratamiento con glutaraldehído tiende a no ser reproducible de forma fiable puesto que diferentes lotes de glutaraldehído pueden dar lugar a resultados variables. El tratamiento con glutaraldehído también puede dar lugar a la reticulación de la proteína transportadora.

Son necesarios procedimientos de conjugación de PNAG desacetilada a una proteína transportadora adicionales, que eviten el uso de glutaraldehído para maximizar la utilidad de la PNAG como componente de una vacuna.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la conjugación de una PNAG que está menos del 35 % N-acetilada a una proteína transportadora, que comprende las etapas de;

a) activar la PNAG añadiendo un enlazador que comprende un grupo maleimida seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMP, para formar una PNAG activada;

b) activar la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo que tiene una longitud de espaciador de 10-25 Angstrom, para formar una proteína transportadora activada; y

c) hacer reaccionar la PNAG activada y la proteína transportadora activada para formar un conjugado de PNAG-proteína transportadora; o

- a) activar la PNAG añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo que tiene una longitud de espaciador de 10-25 Angstrom, para formar una PNAG activada;
- b) activar la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo maleimida seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMP, para formar una proteína transportadora activada; y
- c) hacer reaccionar la PNAG activada y la proteína transportadora activada para formar un conjugado de PNAG-proteína transportadora.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la fabricación de una vacuna que comprende llevar a cabo el procedimiento de conjugación de la invención y la adición de una etapa adicional de combinación del conjugado de PNAG-proteína transportadora con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un conjugado de PNAG-proteína transportadora que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un conjugado de PNAG-proteína transportadora en el que la PNAG está menos del 35 % N-acetilada y la PNAG y la proteína transportadora están unidas mediante un enlazador que comprende un grupo maleimida enlazado a un átomo de azufre o un átomo de azufre enlazado a un átomo de azufre.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona una PNAG activada que tiene menos del 35 % de N-acetilación en el que la PNAG está enlazada covalentemente a un enlazador que comprende un grupo maleimida.

De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende un conjugado de PNAG-proteína transportadora que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de PNAG-proteína transportadora de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad estafilocócica.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un uso del conjugado de PNAG-proteína transportadora de la invención en la preparación de una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad estafilocócica.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento o prevención de una enfermedad estafilocócica que comprende la etapa de administrar la vacuna de la invención a un paciente humano o animal.

### **Descripción detallada**

La presente invención describe un procedimiento para la conjugación de una PNAG que está menos del 35, 30, 20, 15, 10 o 5 % N-acetilada a una proteína transportadora, que comprende las etapas de:

- a) activar la PNAG añadiendo un enlazador que comprende un grupo maleimida seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMP para formar una PNAG activada;
- b) activar la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo que tiene una longitud de espaciador de 10-25 Angstrom para formar una proteína transportadora activada; y
- c) hacer reaccionar la PNAG activada y la proteína transportadora activada para formar un conjugado de PNAG-proteína transportadora.

Como un aspecto independiente de la invención, la presente invención describe un procedimiento para la conjugación de una PNAG que está menos del 35, 30, 20, 15, 10 o 5 % N-acetilada a una proteína transportadora, que comprende las etapas de:

- a) activar la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo maleimida seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMP para formar una proteína transportadora activada;
- b) activar la PNAG añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo que tiene una longitud de espaciador de 10-25 Angstrom para formar una PNAG activada; y
- c) hacer reaccionar la PNAG activada y la proteína transportadora activada para formar un conjugado de PNAG-proteína transportadora.

El término PNAG comprende tanto a dPNAG como a PNAG. La PNAG está menos del 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2 o 1 % N-acetilada de manera que está predominantemente en forma desacetilada. Los epítomos desacetilase de la PNAG pueden suscitar anticuerpos que son capaces de mediar la destrucción opsónica de bacterias grampositivas, por ejemplo *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. En una realización, la PNAG no está O-succinilada o está O-succinilada en menos del 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 o 0,1 % de los restos.

La PNAG puede ser de diferentes tamaños que varían desde por encima de 400 kDa a entre 75 y 400 kDa a entre 10 y 75 kDa para oligosacáridos compuestos de hasta 30 unidades de repetición. En el procedimiento de la invención se pueden usar polisacáridos u oligosacáridos de PNAG de cualquier tamaño, por ejemplo, por encima de 40, 50, 60, 80, 100 o 200 kDa o entre 40-400 kDa, 50-350 kDa, 40-300 kDa, 60-300 kDa, 50-250 kDa, 60-200 kDa, 70-150 kDa u 80-120 kDa. El tamaño se puede conseguir mediante cualquier procedimiento conocido en la materia, por ejemplo, mediante microfluidización, irradiación ultrasónica o por escisión química (documentos WO 03/53462, EP497524, EP497525).

- 5 En una realización, la PNAG se desacetila para formar dPNAG tratando químicamente el polisacárido nativo. Por ejemplo, la PNAG nativa se trata con una disolución básica, de manera que el pH se eleva por encima de 10. Por ejemplo, la PNAG se trata con NaOH, KOH o NH<sub>4</sub>OH 0,1-5 M, 0,2-4 M, 0,3-3 M, 0,5-2 M, 0,75-1,5 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 2 M, aproximadamente 5 M o aproximadamente 1 M. El tratamiento tiene lugar durante al menos 10 o 30 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o 24 horas, a una temperatura de 20-100, 25-80, 30-60 o 30-50, o 35-45 °C. La dPNAG se puede preparar como se describe en el documento WO 04/43405.
- La conjugación es el acoplamiento covalente de la PNAG a una proteína transportadora. Puede ser directa o indirecta, incorporando un compuesto reticulante adicional que es reactivo con los grupos maleimida y sulfhidrilo de la PNAG activada y la proteína transportadora activada.
- 10 El término enlazador se refiere a la molécula que une covalentemente la PNAG y la proteína transportadora en el conjugado completo. El enlazador se puede originar a partir del enlace covalente de dos moléculas usadas en la reacción de conjugación. Alternativamente, el enlazador puede proceder de una sola molécula usada en la reacción de conjugación (por ejemplo, cuando un grupo sulfhidrilo de un resto cisteína de la proteína transportadora reacciona con un grupo maleimida o sulfhidrilo en la PNAG activada).
- 15 En un aspecto de la primera realización, el enlazador que comprende un grupo maleimida se une a un grupo amina en la PNAG durante la etapa a).  
En un aspecto de la segunda realización, el enlazador que comprende un grupo maleimida se une a un grupo amina en la proteína transportadora durante la etapa b).
- 20 En una realización, el enlazador comprende un grupo maleimida que procede de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMPB.
- En una realización, el enlazador que comprende un grupo maleimida tiene una longitud de espaciador de 5-10, 6-8, 10-20, 12-17, aproximadamente 7, aproximadamente 10 o aproximadamente 15 Angstroms.
- 25 En una realización durante la etapa a), la relación ponderal de PNAG con respecto al enlazador que comprende un grupo maleimida es de 1:5-5:1, 1:2-2:1, 1:1,5-1,5:1 o aproximadamente 1:1.  
Por aproximadamente o alrededor de se quiere decir que el número debe estar dentro del 10 % del proporcionado.
- En una realización, la etapa de activación de la PNAG o de la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo maleimida se lleva a cabo a un pH de 6,0-8,0, 6,5-7,5 o aproximadamente 7,0.
- 30 En una realización, el enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo se une a un grupo amina en la proteína transportadora durante la etapa a) o b). En una realización, el enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo se une a un grupo amina en la PNAG durante la etapa b).
- En una realización, el enlazador comprende un grupo sulfhidrilo que procede o que se puede obtener de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en LC-SPDP, SMPT, LC-SMPT, Sulfo-SMPT, Sulfo-LC-SMPT, Sulfo-LC-SPDP y tiolactona de N-acetilhomocisteína.
- 35 En una realización, el enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo tiene una longitud de espaciador de 10-25, 10-20, 13-17 o aproximadamente 15 Angstroms.
- En una realización en la que la PNAG se activa añadiendo un primer enlazador y la proteína transportadora se activa añadiendo un segundo enlazador, el primer y segundo enlazadores opcionalmente proceden o se pueden obtener a partir de GMBS y LC-SPDP, Sulfo-GMBS y LC-SPDP, LC-SPDP y GMBS; o LC-SPDP y Sulfo-GMBS, respectivamente.
- 40 En una realización, durante la etapa de activación de la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo, la relación ponderal de la proteína transportadora con respecto al enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo es de 100:1-1:1, 50:1-2:1, 20:1-3:1, 15:1-5:1 o aproximadamente 10:1.
- 45 En una realización, la etapa de activación de la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo se lleva a cabo a un pH de 7,0-9,0, 7,5-8,5 o aproximadamente 8,0.
- En una realización, durante la etapa c) la relación ponderal de la PNAG activada con respecto a la proteína transportadora activada es de 10:1-1:10, 9:1-1:5, 8:1-1:2, 7:1-1:1, 5:1-1:1 o aproximadamente 2:1.
- En una realización, la etapa c) se lleva a cabo a un pH de 6,0-9,0, 6,0-8,0, 6,5-7,5 o aproximadamente 7,0.
- 50 En una realización, la longitud del enlazador entre la PNAG y la proteína transportadora después de la finalización de la etapa c) es de 5-40, 10-30, 12-25, 10-15, 15-25, 20-25, 20-30, 25-30, 30-40, aproximadamente 14, aproximadamente 23, aproximadamente 28 o aproximadamente 30 Angstroms.
- En una realización, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional d) de bloqueo del exceso de grupos maleimida con cisteína.
- 55 En una realización, la proteína transportadora se selecciona del grupo que consiste en el toxoide tetánico, el toxoide diftérico, CRM197, rEPA, proteína D, proteína de unión a SitC/MntC/saliva, EhbA, EhbB, proteína de unión a la elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npsa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, proteína de unión al fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, IsdA, IsdB, HarA, SitC, toxina alfa (Hla), mutante de toxina alfa H35R, MRPII y autolisina, o

sus fragmentos.

Los ejemplos de proteínas transportadoras que se usan actualmente para el acoplamiento a inmunógenos de polisacáridos u oligosacáridos incluyen los toxoides diftérico y tetánico (DT, DT CRM197 y TT), hemocianina de lapa californiana (KLH), exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) y la proteína purificada procedente de la tuberculina (PPD), la proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina o fragmentos de cualquiera de los anteriores. Los fragmentos adecuados para su uso incluyen fragmentos que engloban epítomos de linfocitos T auxiliares. En particular, el fragmento de la proteína D preferentemente contendrá el tercio N-terminal de la proteína. La proteína D es una proteína de unión a IgD procedente de *Haemophilus influenzae* (documento EP 0 594 610 B1).

Una proteína transportadora alternativa a usar en el procedimiento de la invención es una proteína estafilocócica sola o un fragmento de la misma, o una proteína de fusión que comprende al menos, o exactamente, 1, 2, 3 o 4, o más de las proteínas estafilocócicas, por ejemplo, seleccionadas entre las desveladas a continuación o fragmentos de las mismas.

En una realización, se usa como proteína transportadora la toxina alfa. La forma nativa puede estar conjugada con un polisacárido puesto que el procedimiento de conjugación reduce altamente o elimina la toxicidad. Preferentemente se usa como transportador una toxina alfa genéticamente destoxificada tal como las variantes His35Leu o His35Arg, puesto que la toxicidad residual es menor. Alternativamente, la toxina alfa se destoxifica químicamente mediante el tratamiento con un reactivo reticulante, formaldehído o glutaraldehído. Una toxina alfa genéticamente destoxificada se destoxifica de manera opcional químicamente, preferentemente mediante el tratamiento con un reactivo reticulante, formaldehído o glutaraldehído, para reducir adicionalmente la toxicidad.

En una realización, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de combinación del conjugado de PNAG-proteína transportadora con un excipiente farmacéuticamente aceptable que opcionalmente comprende un adyuvante.

Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, magnesio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente, o polifosfacenos.

En una realización, el adyuvante es un inductor preferencial de cualquiera de las dos respuestas tipo TH1 o TH2. Niveles elevados de citoquinas tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células frente a un antígeno dado, mientras que niveles elevados de citoquinas tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales frente al antígeno.

Es importante recordar que la distinción de respuesta inmunitaria tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo mantendrá una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. No obstante, a menudo es conveniente considerar las familias de citoquinas en los términos descritos en los clones de linfocitos T CD4 + $\nu$  murino por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, págs. 145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas a la producción de las citoquinas INF- $\gamma$  e IL-2 por los linfocitos T. Los linfocitos T no producen otras citoquinas a menudo asociadas directamente a la inducción de respuestas inmunitarias tipo Th1, tales como la IL-12. En contraste, las respuestas tipo Th2 están asociadas a la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Los sistemas adyuvantes adecuados que estimulan una respuesta predominantemente Th1 incluyen: Monofosforil lípido A o uno de sus derivados, particularmente el monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación véase el documento GB 2220211 A); y una combinación del monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con una sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En tales combinaciones, el antígeno y el 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, permitiendo un suministro más eficaz de las señales antigénicas e inmunoestimulantes. Hay estudios que han demostrado que el 3D-MPL es capaz de potenciar adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en alumbre [Thoelen y col., Vaccine (1998) 16:708-14; documento EP 689454-B1].

Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL, como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en donde el QS21 se inactiva con colesterol como se desvela en el documento WO 96/33739. En el documento WO 95/17210 se describe una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua. Opcionalmente, la vacuna comprende de manera adicional una saponina, más preferentemente QS21. La formulación también puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol (documento WO 95/17210). La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una formulación de vacuna que comprende la mezcla de un conjugado de PNAG de la presente invención con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como el 3D-MPL. Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilados (documento WO 96/02555) también son inductores preferentes de una respuesta TH1 y son adecuados para su uso en la presente invención. El adyuvante forma opcionalmente una estructura liposómica o una estructura ISCOM.

La relación de QS21:esterol normalmente será del orden de 1:100 a 1:1 peso en peso. En una realización, el esteroles está presente en exceso, siendo la relación de QS21:esterol de al menos 1:2 p/p. Normalmente, para la administración a humanos el QS21 y el esteroles estarán presentes en una vacuna en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ g a aproximadamente 100  $\mu$ g, o de aproximadamente 10  $\mu$ g a aproximadamente 50  $\mu$ g por dosis.

Los liposomas opcionalmente contienen un lípido neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que opcionalmente es no cristalino a temperatura ambiente, por ejemplo, fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina o dilauril fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que incrementa la estabilidad de la

estructura del liposoma-QS21 para liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos, la cantidad de lípido cargado es opcionalmente del 1-20 % p/p, opcionalmente del 5-10 %. La relación de esterol con respecto a fosfolípido es del 1-50 % (mol/mol), opcionalmente del 20-25 %.

5 En una realización, el adyuvante contiene MPL (monofosforil lípido A 3-desacilado, también conocido como 3D-MPL). El 3D-MPL se conoce del documento GB 2 220 211 (Ribi) como una mezcla de 3 tipos de monofosforil lípido A des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas y está fabricado por Ribi Immunochem, Montana (documento WO 92/116556).

10 En una realización, el adyuvante contiene liposomas preparados inicialmente sin MPL, a los cuales se le añade a después MPL, opcionalmente como partículas de 100 nm. Por tanto, el MPL no está contenido dentro de la membrana de la vesícula (conocido como MPL externo). Las composiciones en que el MPL está contenido dentro de la membrana de la vesícula (conocido como MPL interno) también forman un aspecto de la invención. El antígeno puede estar contenido dentro de la membrana de la vesícula o contenido fuera de la membrana de la vesícula. Opcionalmente, los antígenos solubles son externos y los antígenos hidrófobos o lipidados están contenidos dentro o fuera de la membrana.

15 En una realización, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de combinación del conjugado de PNAG-proteína transportadora con un antígeno (o antígenos) adicional. En una realización, se añaden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 antígenos adicionales. En una realización, el antígeno (o antígenos) adicional comprende un polisacárido u oligosacárido bacteriano.

20 Los ejemplos de tales antígenos incluyen polisacáridos u oligosacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus* tipo 5 y/o tipo 8.

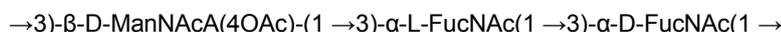
25 La mayoría de cepas de *S. aureus* que provocan infecciones en el hombre contienen cualquiera de los dos polisacáridos de tipo 5 o tipo 8. Aproximadamente el 60 % de cepas humanas son de tipo 8 y aproximadamente el 30 % son de tipo 5. Las estructuras de los antígenos polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 están descritas en Moreau y col., Carbohydrate Res. 201; 285 (1990) y Fournier y col., Infect. Immun. 45; 87 (1984). Ambas tienen FucNAcp en su unidad de repetición así como ManNAcA, que se pueden usar para introducir un grupo sulfhidrilo.

Recientemente (Jones Carbohydrate Research 340, 1097-1106 (2005)), la espectroscopía de RMN revisó las estructuras de estos polisacáridos capsulares para:

Tipo 5



30 Tipo 8



Los polisacáridos se pueden extraer de la cepa apropiada de *S. aureus* usando procedimientos muy conocidos por la persona experta, por ejemplo, como se describe en el documento US6294177. Por ejemplo, la ATCC 12902 es una cepa de *S. aureus* de tipo 5 y la ATCC 12605 es una cepa de *S. aureus* de tipo 8.

35 Los polisacáridos tienen el tamaño nativo o alternativamente se pueden dimensionar, por ejemplo, mediante microfluidización, irradiación ultrasónica o por tratamiento químico. En el procedimiento de la invención también se pueden usar oligosacáridos.

40 Los polisacáridos de tipo 5 y 8 usados en el procedimiento de la invención opcionalmente están conjugados (por ejemplo, usando el procedimiento desvelado en uno cualquiera de los documentos US4372945, US4474757, US4356170, US4830852 o WO 95/08348) a una proteína transportadora que puede ser cualquiera de las descritas anteriormente o alternativamente están sin conjugar.

En una realización, el antígeno (o antígenos) adicional comprende el antígeno 336 de *S. aureus* desvelado en el documento US6294177.

45 En una realización, el antígeno 336 es un polisacárido que tiene el tamaño nativo o alternativamente se puede dimensionar, por ejemplo, mediante microfluidización, irradiación ultrasónica o por tratamiento químico. También se pueden usar oligosacáridos procedentes del antígeno 336. El antígeno 336 preferentemente está conjugado a una proteína transportadora usando cualquier procedimiento de conjugación conocido, por ejemplo los desvelados en los documentos US4372945, US4474757, US4356170, US4830852 o WO 95/08348, o alternativamente está sin conjugar.

50 Las cepas ATCC-31432, SE-360 y SE-10 de *S. epidermidis* son características de tres tipos capsulares diferentes, I, II y III respectivamente (Ichiman y Yoshida 1981, J. Appl. Bacteriol. 51; 229). Los polisacáridos capsulares extraídos de cada serotipo de *S. epidermidis* constituyen los polisacáridos de tipo I, II y III. Los polisacáridos se pueden extraer mediante varios procedimientos, incluyendo el procedimiento desvelado en el documento US4197290 o como se describe en Ichiman y col., 1991, J. Appl. Bacteriol. 71; 176.

55 En una realización de la invención, el antígeno (o antígenos) adicional comprende polisacáridos u oligosacáridos de tipo I y/o II y/o III de *S. epidermidis*. Los polisacáridos tienen el tamaño nativo o alternativamente se pueden dimensionar, por ejemplo, mediante microfluidización, irradiación ultrasónica o por escisión química. El antígeno(o antígenos) adicional también puede incluir oligosacáridos extraídos de cepas de *S. epidermidis*. Estos polisacáridos u oligosacáridos están sin conjugar o preferentemente se conjugan usando cualquier procedimiento de conjugación conocido, por ejemplo, los desvelados en los documentos US4372945, US4474757, US4356170, US4830852 o WO

95/08348.

En una realización, el antígeno(o antígenos) adicional comprende una proteína estafilocócica o un fragmento de la misma. Por ejemplo, una proteína de *S. aureus* o *S. epidermidis*. Algunas realizaciones de la invención contienen proteínas tanto de *S. aureus* como de *S. epidermidis*.

5 El antígeno(o antígenos) adicional es, por ejemplo, una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85 %, preferentemente una identidad de al menos el 90 %, más preferentemente una identidad de al menos el 95 %, muy preferentemente de al menos el 97-99 % o una identidad exacta, con la de cualquier secuencia de la Figura 1 o el documento WO 06/32475.

10 Cuando en el presente documento se mencione específicamente una proteína, puede ser una referencia a una proteína de longitud completa, nativa o recombinante, u opcionalmente una proteína madura en la cual se ha eliminado toda secuencia de señalización. La proteína se puede aislar directamente a partir de la cepa estafilocócica o se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. Los fragmentos inmunogénicos de la proteína se pueden incorporar a la composición inmunogénica de la invención. Éstos son fragmentos que comprenden al menos 10 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos o al menos 100 aminoácidos, tomados de manera contigua de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, tales fragmentos inmunogénicos normalmente son inmunológicamente reactivos con los anticuerpos generados contra las proteínas estafilocócica o con los anticuerpos generados por la infección de un hospedador mamífero con estafilococos, o contienen epítopos de linfocitos T. Los fragmentos inmunogénicos también incluyen fragmentos que, cuando se administran a una dosis eficaz (bien solos o como un hapteno unido a un transportador), suscitan una respuesta inmunitaria protectora contra la infección estafilocócica, y opcionalmente es protectora contra la infección por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Tal fragmento inmunogénico puede incluir, por ejemplo, la proteína que carece de una secuencia líder N-terminal y/o un dominio transmembrana, y/o un dominio de anclaje C-terminal. En una realización, el fragmento inmunogénico usado en el procedimiento de la invención comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de una proteína que tiene una identidad de al menos el 85 %, al menos del 90 %, al menos del 95 % o una identidad de al menos el 97-99 %, con la de una secuencia seleccionada de la Figura 1 o el documento WO 06/32475, a lo largo de toda la longitud de la secuencia del fragmento.

30 En una realización, el antígeno (o antígenos) adicional puede contener proteínas de fusión de proteínas de estafilocócicas o fragmentos de proteínas estafilocócicas. Tales proteínas de fusión se pueden fabricar de manera recombinante y pueden comprender una porción de al menos 2, 3, 4, 5 o 6 proteínas estafilocócicas. Alternativamente, una proteína de fusión puede comprender múltiples porciones de al menos 2, 3, 4, o 5 proteínas estafilocócicas. Estas pueden combinar diferentes proteínas estafilocócicas o fragmentos de las mismas en la misma proteína. Alternativamente, la invención también incluye proteínas de fusión individuales de proteínas estafilocócicas o fragmentos de las mismas, como una proteína de fusión con secuencias heterólogas tal como un proveedor de epítopos de linfocitos T o etiquetas de purificación, por ejemplo:  $\beta$ -galactosidasa, glutation-S-transferasa, proteínas verdes fluorescentes (GFP), etiquetas de epítopos tales como FLAG, etiqueta myc, polihistidina o proteínas de superficie víricas tales como hemaglutinina del virus de la gripe o proteínas bacterianas tales como el toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197.

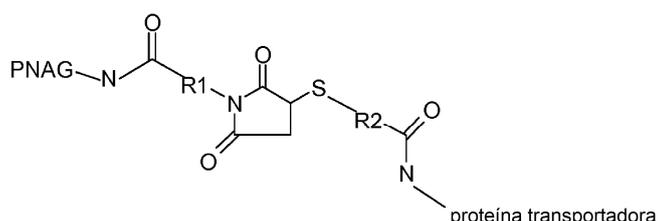
40 El antígeno (o antígenos) adicional opcionalmente comprende una proteína de unión a un componente extracelular estafilocócico o una proteína transportadora estafilocócica, o una toxina estafilocócica o un regulador de la virulencia. El antígeno (o antígenos) adicional opcionalmente comprende al menos, o exactamente, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 proteínas estafilocócicas. Los ejemplos de proteínas de unión a un componente extracelular son el receptor de laminina, la proteína de unión a SitC/MntC/saliva, EhbA, EhbB, la proteína de unión a elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, la proteína de unión a vitronectina, la proteína de unión al fibrinógeno, la coagulasa, Fig y MAP. Los ejemplos de proteínas transportadoras estafilocócicas son el transportador ABC inmunodominante, IsdA, IsdB, el transportador de  $Mg^{2+}$ , SitC y el transportador de Ni ABC. Los ejemplos de toxinas o reguladores de la virulencia estafilocócicos son la toxina alfa (Hla), el mutante de la toxina alfa H35R y la proteína activadora de ARN III (RAP).

50 Un aspecto adicional de la invención es un conjugado de PNAG-proteína transportadora que se puede obtener o se obtiene mediante el procedimiento de la invención.

El conjugado de PNAG-proteína transportadora de la invención comprende PNAG que está menos del 40 % N-acetilado, y la PNAG y la proteína transportadora están unidas por un enlazador que comprende un grupo maleimida unido a un átomo de azufre.

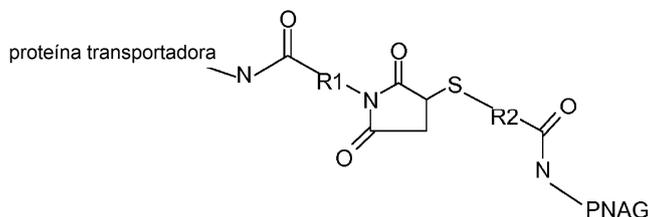
55 En una realización, el grupo maleimida está situado entre la PNAG y el átomo de azufre. Alternativamente, el grupo maleimida está situado entre la proteína transportadora y el átomo de azufre.

En una realización, el conjugado de PNAG-proteína transportadora tiene la estructura:



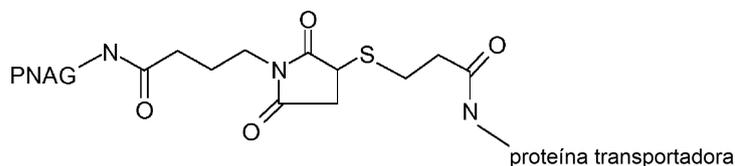
en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente entre una cadena aromática o alifática, opcionalmente sustituida, o un enlace. En una realización R1 es un alquilo C1-C6, un alquilo C2-C5, un alquilo C3-C4, un alquilo C2, un alquilo C3, un alquilo C4 o un alquilo C5. En una realización R2 es un alquilo C1-C6, un alquilo C2-C5, un alquilo C3-C4, un alquilo C2, un alquilo C3, un alquilo C4 o un alquilo C5.

5 En una realización, el conjugado de PNAG-proteína transportadora de la invención tiene la estructura:



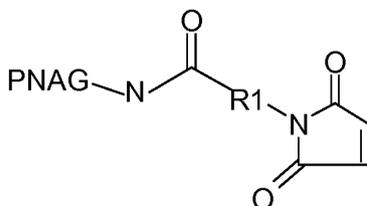
10 en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente entre una cadena aromática o alifática, opcionalmente sustituida, o un enlace. En una realización R1 es un alquilo C1-C6, un alquilo C2-C5, un alquilo C3-C4, un alquilo C2, un alquilo C3, un alquilo C4 o un alquilo C5. En una realización R2 es un alquilo C1-C6, un alquilo C2-C5, un alquilo C3-C4, un alquilo C2, un alquilo C3, un alquilo C4 o un alquilo C5.

En una realización de la divulgación, el conjugado de PNAG-proteína transportadora tiene la estructura:



15 Un aspecto adicional de la divulgación es una PNAG activada que tiene menos del 40 % de N-acetilación, en la que la PNAG está enlazada covalentemente a un enlazador que comprende un grupo maleimida. En una realización, el grupo maleimida procede o se puede obtener de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMPB.

En una realización de la divulgación, la PNAG activada tiene la estructura:



20 en la que R1 se selecciona de una cadena aromática o alifática, opcionalmente sustituida, o un enlace. En una realización R1 es un alquilo C1-C6, un alquilo C2-C5, un alquilo C3-C4, un alquilo C2, un alquilo C3, un alquilo C4 o un alquilo C5. En una realización, el enlazador es de 5-40, 10-30, 12-25, 10-15, 15-25, 20-25, 20-30, 25-30, 30-40, aproximadamente 14, aproximadamente 23, aproximadamente 28 o aproximadamente 30 Angstroms.

25 Los conjugados de PNAG-proteína transportadora y las preparaciones de vacuna realizados mediante el procedimiento de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar un mamífero susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de una vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de la administración en las mucosa en los tractos oral/digestivo, respiratorio, genitourinario. Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, sus componentes también se pueden coadministrar juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes. Para la coadministración, puede estar presente el adyuvante de Th1 optativo en cualquiera o en todas las distintas administraciones, no obstante, si está presente, es preferente en combinación con el componente de la proteína bacteriana de la vacuna. Además de una vía de administración única se pueden usar dos vías de administración diferentes. Por ejemplo, los polisacáridos se pueden administrar i.m. (i.d.) y las proteínas bacterianas se pueden administrar i.n. (i.d.). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar i.m. en la dosis de sensibilización e i.n. para las dosis de refuerzo.

35 La cantidad de antígeno del conjugado en cada dosis de la vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplea y de cómo se presenta. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 0,1-100 µg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 µg para conjugados de polisacáridos, preferentemente 0,1-10 µg, más preferentemente 1-10 µg, de los cuales de 1 a 5 µg es un intervalo más preferente.

40 El contenido de antígenos proteicos en la vacuna normalmente estará en el intervalo de 1-100 µg, preferentemente de 5-50 µg, más habitualmente en el intervalo de 5-25 µg. Después de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir

una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas de manera adecuada.

La preparación de la vacuna se describe de manera general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas está descrito por Fullerton, patente de Estados Unidos 4.235.877.

- 5 Las vacunas de la presente invención se pueden almacenar en disolución o liofilizadas. Preferentemente, la disolución se liofiliza en presencia de un azúcar tal como sacarosa, trehalosa o lactosa. Aún es más preferente que se liofilicen y se reconstituyan de forma extemporánea antes de su uso. La liofilización puede dar como resultado una composición más estable (vacuna) y posiblemente puede dar lugar a títulos de anticuerpos mayores en presencia de 3D-MPL y en ausencia de un adyuvante basado en aluminio. En el presente documento, está previsto por los inventores que los términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" sean opcionalmente sustituibles por las expresiones "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

10 Para que la presente invención se pueda entender mejor se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen solo fines ilustrativos.

### Ejemplos

#### 15 Ejemplo 1 Preparación de un conjugado de PNAG-TT

Se preparó dPNAG como se describe en el documento WO 04/43405. La dPNAG se purificó adicionalmente en una columna Superose 6.

#### Activación de la dPNAG

- 20 Se disolvió dPNAG (12 mg) en 300 µl de HCl 5 M + 300 µl de NaOH 5 M + 1700 µl de PBS 1 x a pH 7,0, y el pH se ajustó a 7,0. La muestra se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y el pH se ajustó de nuevo a 7,0. Se añadió 12 mg de GMBS en 200 µl de DMSO y la muestra se agitó lentamente durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. El pH se mantuvo en 7,0 con NaOH 0,5 M. Se retiró el GMBS en exceso con una columna desaladora (columna PD10) equilibrada con tampón PBS 1 x, EDTA 10 mM a pH 7,0 y la muestra se concentró hasta 0,6 ml usando un dispositivo de concentración Centricon de 10 kDa de MWCO (forma siglada de *molecular weight cut off*, límite de peso molecular).

#### Activación del TT

- 30 Se añadió el toxoide tetánico (TT) (6,5 mg; 195 µl de disolución madre) a 1105 µl de PBS 1 x que contenía EDTA 10 mM a pH 8,0. Se añadió 130 µl de SPDP (6,2 mg/ml en DMSO) a la disolución de proteína y se agitó lentamente durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. El pH se mantuvo en 8,0 usando NaOH 0,5 M. Se retiró el SPDP en exceso usando una columna desaladora (columna PD10) equilibrada con tampón PBS 1 x, EDTA 10 mM a pH 8,0 y la muestra se concentró hasta 1,3 ml usando un Centricon de 10 kDa de MWCO. Se añadió 0,65 ml de DTT (23 mg/ml en tampón PBS 1 x, EDTA 10 mM a pH 8,0) a 1,3 ml del TT activado con SPDP. La muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El pH se mantuvo en 8,0 usando NaOH 0,5 M. Se retiró el DTT en exceso con una columna desaladora (columna PD10) equilibrada con tampón PBS 1 x, EDTA 10 mM a pH 7,0 y la muestra se concentró hasta 0,6 ml usando un dispositivo de concentración Centricon de 10 kDa de MWCO.

- 40 La dPNAG activada con GMBS (0,6 ml) + SH-SPDP-TT (0,6 ml) se mezclaron y se agitaron lentamente durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Las maleimidias en exceso se bloquearon con 3 mg de cisteína en 100 µl de PBS 1 x, EDTA 10 mM a pH 7,0 durante 30 minutos. La muestra se sometió a cromatografía en una columna Superose 6 a 1 ml/min con PBS 1 x, EDTA 10 mM a pH 7,0 como tampón de corrida. Las fracciones se probaron para la proteína usando un ensayo de Bradford. Las fracciones que contenían el conjugado se combinaron y se concentraron hasta 25 ml usando el adsorbente Spectra/gel. El conjugado final se probó para la composición de polisacárido y proteína.

#### Composición de dPNAG-TT

- 45 dPNAG: 153,37 µg/ml (46,3 %)  
TT: 178,06 µg/ml (53,7 %)

### Ejemplo 2

#### **Activación y acoplamiento de la dPNAG**

#### Conjugados de dPNAG-TT

- 50 Los siguientes conjugados se prepararon usando las estrategias descritas a continuación en el presente documento:

- dPNAG-TT010: dPNAG-S-GMBS + TT-LC-SPDP tratado con DTT  
dPNAG-TT011: dPNAG-S-GMBS + TT-LC-SPDP tratado con DTT  
dPNAG-TT012: dPNAG-S-GMBS + TT-SPDP tratado con DTT  
dPNAG-TT014: dPNAG-SPDP + TT-SPDP tratado con DTT  
55 dPNAG-TT017: dPNAG-SPDP tratado con DTT + TT-LC-SPDP  
dPNAG-TT019: dPNAG-S-GMBS + TT-SPDP tratado con DTT  
dPNAG-TT020: dPNAG-S-GMBS + TT-SPDP tratado con DTT

dPNAG

Se disolvió 1 g de PNAG en HCl 5 N a una concentración de 20 mg/ml y se incubó durante 1 hora. A continuación se neutralizó con NaOH 5 N. La disolución se clarificó en una membrana de 5 µm y se purificó en Sephacryl S400HR. Las fracciones de interés, correspondientes al "tamaño molecular medio" (véase Infection and Immunity, 70: 4433-4440 (2002)), se combinaron y se concentraron antes del tratamiento de des-N-acetilación.

La disolución se ajustó a NaOH 1 M y se dejó 24 horas a 37 °C. Después de la neutralización, el producto se sometió a diálisis y concentración.

Activación de la dPNAG

Se añadió S-GMBS (N-(γ-maleimidobutiriloxi) sulfosuccinimida, Pierce) a la dPNAG en NaCl 0,2 M (relación S-GMBS/PS (p/p):1/1) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente a pH 7,0 (regulación del pH usando NaOH 1 M). La GMBS en exceso y los subproductos se retiraron mediante purificación en Toyopearl HW-40F usando PBS, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM a pH 7,2 como tampón de elución, con un caudal fijado a 60 ml/h. La combinación de elución se seleccionó en función de la densidad óptica (UV = 206 nm) y a continuación se concentró en tubos Vivaspin de 3000 de MWCO o Amicon Ultra de 10.000 de MWCO.

Acoplamiento

La dPNAG activada por GMBS y el TT-SPDP reducido con DTT se mezclaron y se agitaron a temperatura ambiente. De acuerdo con las condiciones usadas la reacción se inactivó después de 20-120 min mediante la adición de cisteína (4 mg/ml en tampón fosfato de Na a pH 8,0) durante 30 minutos. El conjugado se clarificó en un filtro de 5 µm y se inyectó en una resina Sephacryl S300HR (XK16/100) para su purificación. La elución se realizó en NaCl 200 mM con un caudal fijado a 30 ml/h. Las fracciones de elución se analizaron mediante hexosamina y mediante dosificación de proteína. Las fracciones de interés se combinaron y se filtraron en un Sterivex de 0,22 µm. El conjugado final se probó para la composición de polisacárido (dosificación de hexosamina) y de proteína (dosificación de Lowry).

Conjugado	% de nivel de N-acetilación	[dPNAG] mg/ml	[TT] mg/ml	Escala de PS (mg)	Tiempo de acoplamiento (min)
dPNAG-TT 010	10*	15	15	30	120
dPNAG-TT 011	10*	12	24	20	120
dPNAG-TT 012	10*	17,5	35	22	80
dPNAG-TT 019	34	5	10	10	20
dPNAG-TT 020	34	2	2	10	20

\*No realizado en el lote usado en la conjugación, pero estimado en un lote anterior por RMN usando el mismo procedimiento de des-N-acetilación.

Conjugado	Relación TT/PS inicial (p/p)	Relación TT/PS final (p/p)	Rendimiento rec. PS (%)	Rendimiento de filtración (%)
dPNAG-TT010	1/1	1,86/1	43	99
dPNAG-TT011	2/1	2,86/1	56	99
dPNAG-TT012	2/1	2,29/1	61	108
dPNAG-TT019	2/1	1,45/1	81	97
dPNAG-TT020	1/1	0,89/1	82	109

dPNAG-SPDP:

Se añadió SPDP (propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio), PM: 312,4, Pierce) en un exceso molar de 5 veces disuelto en DMSO (dimetilsulfóxido, Merck) a 100 mg de dPNAG a 5 mg/ml en fosfato de Na 100 mM, pH 7,2 y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Antes de la purificación en Sephacryl S100HR (XK16/40) la mezcla de reacción se concentró hasta ± 6 ml en un Amicon Ultra de 10.000 de MWCO (centrifugación a 3000 rpm durante 28 min). La elución se realizó en tampón fosfato a pH 7,4 con un caudal fijado a 60 ml/h. Las fracciones de interés (leídas a 206 nm) se combinaron y se concentraron hasta 1,1 ml en un Amicon Ultra de 10.000 de MWCO (centrifugación a 3000 rpm durante 30 min).

TT-SPDP:

Se añadió SPDP (Pierce) en un exceso molar de 15 veces disuelto en DMSO (dimetilsulfóxido, Merck) a 1 g de TT (50 mg/ml) en fosfato de Na 100 mM pH 7,2 y se incubó 80 min a temperatura ambiente. A continuación el producto se inyectó en Sephacryl S100HR (XK16/40) y se eluyó en acetato de Na 100 mM a pH 5,6, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM con una velocidad de flujo fijada a 60 ml/h. La combinación de elución se seleccionó en función de la densidad óptica (UV = 280 nm) y a continuación se concentró hasta 19,6 ml en un Amicon Ultra de 10.000 de MWCO (centrifugación a 3000 rpm durante 75 min).

El TT-LC-SPDP se produjo como TT-SPDP pero usando LC-SPDP (hexanoato de succinimidil 6-[3-(2-piridilditio)-propionamido], Pierce) y un tiempo de incubación de 60 min.

#### TT-SH o TT-LC-SH

- 5 Se añadió DTT a TT-SPDP o TT-LC-SPDP en una relación de DTT/TT (mg/mg) de 0,7/1. Después de 2 h a temperatura ambiente, se siguió la liberación de piridin-2-tiona por su absorbancia característica a 343 nm. La proteína tiolada se purificó a partir del DTT en exceso por filtración en gel (PD-10, Amersham). Después de la concentración en un Amicon Ultra de 10.000 de MWCO, el contenido en proteína se estimó mediante la dosificación de Lowry.

#### dPNAG-SPDP + TT-SH o TT-LC-SH (dPNAG-TT014 y 016)

- 10 El acoplamiento se realizó a temperatura ambiente con agitación continua y con una relación de TT/PS inicial (p/p) de 2/1.  
La dPNAG y el TT-SH se mezclaron para obtener una concentración de PS final de 20 mg/ml y una concentración de proteína final del 40 mg/ml. Después de 30 min, los grupos sulfhidrilo sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de 2-yodoacetamida (Merck).
- 15 La dPNAG y el TT-LC-SH se mezclaron para obtener una concentración de PS final de 10 mg/ml y una concentración de proteína final del 20 mg/ml. Después de 75 min, los grupos sulfhidrilo sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de 2-yodoacetamida (Merck).  
A continuación, el conjugado se clarificó usando un filtro Minisart de 5 µm y se inyectó en Sephacryl S300HR (XK16/100). La elución se realizó en NaCl 200 mM con un caudal fijado a 30 ml/h.
- 20 Las fracciones de elución se analizaron mediante hexosamina y por dosificación de proteínas. Las fracciones de interés se combinaron y se filtraron en un Sterivex de 0,22 µm.

Los conjugados resultantes tenían una relación de TT/PS final (p/p) de 2,18 (TT-SH) y 2,24 (TT-LC-SH).

#### Tiolación de la dPNAG

- 25 Se añadieron 11,6 mg de DTT (1,4-ditiotreitol, Boehringer Mannheim, PM: 154,24) a 16,5 mg de dPNAG-SPDP. Después de 2 h a temperatura ambiente, la liberación de piridin-2-tiona se siguió por su absorbancia característica a 34 nm. La PS tiolada se purificó a partir del DTT en exceso por filtración en gel (Toyopearl HW40F) y a continuación se concentró hasta 860 µl en un Amicon Ultra de 10.000 de MWCO.

#### dPNAG-SH + TT-SPDP (dPNAG-TT017)

- 30 El acoplamiento se realizó a temperatura ambiente con agitación continua y una relación de TT/PS inicial (p/p) de 1,7/1.  
La dPNAG-SH y el TT-SPDP se mezclaron para obtener una concentración de PS final de 7,73 mg/ml y una concentración de proteína final del 13,3 mg/ml. Después de 90 min, los grupos sulfhidrilo sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de 2-yodoacetamida (Merck).
- 35 A continuación, el conjugado se clarificó usando un filtro Minisart de 5 µm y se inyectó en Sephacryl S300HR (XK16/100). La elución se realizó en NaCl 200 mM con un caudal fijado a 30 ml/h.  
Las fracciones de elución se analizaron mediante hexosamina y por dosificación de proteínas. Las fracciones de interés se combinaron y se filtraron en un Sterivex de 0,22 µm.
- El conjugado resultante tiene una relación de TT/PS final (p/p) de 2,74.

### **Ejemplo 3**

#### **Inmunogenicidad de los conjugados de dPNAG-TT de *S. aureus***

- 40 Se inocularon grupos de 30 ratones por vía subcutánea con conjugados de dPNAG-TT de *S. aureus* a una dosis de sacáridos de 0,3 µg, sin adyuvante o combinado con un adyuvante 3D-MPL. Los ratones recibieron tres inoculaciones en los días 0, 14 y 28. El día 41 se recogió suero de los ratones y cada muestra de suero se probó por ELISA para valorar la respuesta inmunitaria frente a la PNAG. Se usaron grupos de 10 ratones en los grupos de control y éstos se inocularon con solución salina.
- 45

#### **ELISA anti-PNAG:**

- Se recubrieron placas de microtitulación de alta unión (Nunc Maxisorp) con PNAG purificada (2,5 µg/ml) mezclada con HSA metilado (2,5 µg/ml), diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante toda la noche a 4 °C.
- 50 Las placas se bloquearon con PBS-BSA al 1 %, 30 min a TA con agitación. Los antisueros de los ratones se prediluyeron a 1/100, y a continuación se hicieron diluciones adicionales a la mitad en microplacas y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar, el anticuerpo murino unido se detectó usando IgG (H+L) de cabra anti-ratón affiniPure conjugada con peroxidasa (ref: 115-035-003) de Jackson ImmunoLaboratories Inc. diluida a 1:5000 en PBS-BSA al 0,2 %-Tween al 0,05 %. Los anticuerpos de detección se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. El color se reveló usando 4 mg de OPD (Sigma) + 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cada 10 ml de tampón citrato 0,1 M a pH 4,5, durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl y la densidad óptica se leyó a 490 nm con respecto a 650 nm.
- 55

Los resultados (mostrados en la Tabla 1) se expresaron en para los sueros combinados. Para los análisis

## ES 2 659 050 T3

individuales de los sueros se calculó un MGT en los títulos de punto medio de las 30 muestras (10 para los controles).

Tabla 1

<b>Conjugado</b>	<b>Título de punto medio de anti-PNAG no adsorbida</b>	<b>Título de punto medio de anti-PNAG Adyuvante A</b>
<b>dPNAG-TT010</b>	1371	28465
<b>dPNAG-TT011</b>	1133	40899
<b>dPNAG-TT019</b>	425	13429
<b>dPNAG-TT020</b>	656	10080
<b>dPNAG-TT014</b>	342	9806
<b>dPNAG-TT017</b>	203	8094
<b>dPNAG-TT012</b>	398	40509
<b>dPNAG-TT016</b>	719	7937
<b>Control</b>	50	50

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de conjugación de una PNAG que está menos del 35 % N-acetilada a una proteína transportadora, que comprende las etapas de:
  - 5 a) activar la PNAG añadiendo un enlazador que comprende un grupo maleimida seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMPB, para formar una PNAG activada;
  - b) activar la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo que tiene una longitud de espaciador de 10-25 Angstroms, para formar una proteína transportadora activada; y
  - 10 c) hacer reaccionar la PNAG activada y la proteína transportadora activada para formar un conjugado de PNAG-proteína transportadora.
  
2. Un procedimiento de conjugación de una PNAG que está menos del 35 % N-acetilada a una proteína transportadora, que comprende las etapas de:
  - 15 a) activar la PNAG añadiendo un enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo que tiene una longitud de espaciador de 10-25 Angstroms, para formar una PNAG activada;
  - b) activar la proteína transportadora añadiendo un enlazador que comprende un grupo maleimida seleccionado del grupo que consiste en BMPS, EMCS, GMBS, MBS, LC-SMCC, SMCC, SMPB, SMPH, Sulfo-EMCS, Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC, Sulfo-GMBS y Sulfo-SMPB, para formar una proteína transportadora activada; y
  - 20 c) hacer reaccionar la PNAG activada y la proteína transportadora activada para formar un conjugado de PNAG-proteína transportadora.
  
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el enlazador que comprende un grupo maleimida está unido a un grupo amina en la PNAG durante la etapa a).
  
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el enlazador que comprende un grupo maleimida está unido a un grupo amina en la proteína transportadora durante la etapa b).
  
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1-4, en el que el enlazador que comprende un grupo maleimida se selecciona del grupo que consiste en GMBS y Sulfo-GMBS.
  
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5, en el que el enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo está unido a un grupo amina en la proteína transportadora durante la etapa b).
  
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el enlazador que comprende un grupo sulfhidrilo se selecciona del grupo que consiste en LC-SPDP, SMPT, LC-SMPT, Sulfo-SMPT, Sulfo-LC-SMPT y Sulfo-LC-SPDP.
  
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la proteína transportadora se selecciona del grupo que consiste en el toxoide tetánico, el toxoide diftérico, CRM197, rEPA, proteína D, proteína de unión a SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de unión a la elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, proteína de unión al fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, IsdA, IsdB, HarA, SitC, toxina alfa (Hla), mutante de toxina alfa H35R, MRPII y autolisina, o fragmentos de los mismos.
  
- 35 9. Un procedimiento de fabricación de una vacuna que comprende llevar a cabo el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y una etapa adicional de combinación del conjugado de PNAG-proteína transportadora con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
  
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende una etapa adicional de combinación del conjugado de PNAG-proteína transportadora con un antígeno (o antígenos) adicional.
  
11. Un conjugado de PNAG-proteína transportadora que se puede obtener mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
  
- 45 12. Una vacuna que comprende el conjugado de PNAG-proteína transportadora de la reivindicación 11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
  
13. El conjugado de PNAG-proteína transportadora de la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad estafilocócica.