

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 953**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2014 PCT/EP2014/051670**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14118201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2014 E 14704300 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2950815**

54 Título: **Vacunas glicoconjugadas polivalentes**

30 Prioridad:

**31.01.2013 IT MI20130142**

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

**11.06.2018**

73 Titular/es:

**BIOSYNTH S.R.L. (100.0%)  
Zona Industriale Loc Sentino  
I-53040 Rapolano Terme, IT**

72 Inventor/es:

**PORRO, MASSIMO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 671 953 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

Vacunas glicoconjugadas polivalentes

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos antígenos conjugados que expresan múltiples epítopos incorporados y a vacunas glicoconjugadas polivalentes y formulaciones que contienen los mismos. Además, la presente invención se refiere al uso de estas vacunas, en particular, para la protección de la población humana y, en particular, para la protección de la población pediátrica de infecciones pulmonares y sistémicas debidas a *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *S. aureus*, o de infecciones intestinales debidas a *S. typhi*, *V. cholerae* y *E. coli*. La presente invención se refiere adicionalmente a nuevas vacunas de glicoconjugados polivalentes para la protección de infecciones sistémicas y genitourinarias de *C. albicans* y *E. coli* o para la protección contra infecciones por *M. bovis* en medicina veterinaria.

15 Las vacunas de conjugados son el estándar de referencia para medir el éxito actual de la inmunología clínica. Desde principios de los noventa, el advenimiento de las vacunas conjugadas para la prevención de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* han mejorado drásticamente la calidad de la vida de la población pediátrica en el mundo occidental. Tal éxito sobresaliente ahora se extenderá a los países en desarrollo del mundo gracias al Programa Ampliado de Inmunización patrocinado por la OMS y los programas nacionales de inmunización recientemente implementados a través del Compromiso de Mercado Avanzado (AMC) de diversos países.

20 Por ejemplo, vacunas como "Prevnar", presentes en los mercados occidentales desde el año 2000 (anteriormente en su formulación de 7-valente y, ahora, en su formulación 13-valente, conteniendo ambas formulaciones polisacáridos específicos de tipo único (Ps) de *S. pneumoniae* conjugado covalentemente a la proteína transportadora CRM197) son actualmente recomendadas por la OMS a todos los países del mundo para una campaña de inmunización sin precedentes para la protección de la población pediátrica contra las infecciones sistémicas por *S. pneumoniae* (IPD o enfermedades neumocócicas invasivas) que finalmente pueden inducir meningitis bacteriana aguda. De hecho, esta patología está bien documentada ya que tiene una alta tasa de mortalidad solo porque el intervalo de tiempo del tratamiento se reduce a las pocas horas desde el comienzo de los síntomas, por lo que la estrategia racional a seguir es la prevención y no la terapia de la enfermedad.

30 Debido a que la cantidad de especies bacterianas, significativamente representativas para las infecciones en seres humanos por *S. pneumoniae*, son muchas (hasta 23 especies bacterianas de las más de 90 especies hoy conocidas) y la estrategia de usar Ps específicos de tipo individuales conjugados con un vehículo proteico demanda una dosificación significativa de la proteína transportadora cuando la formulación de la vacuna contiene diversos antígenos conjugados (p. ej.: 13 ó 15 o más si incluyen los serotipos más importantes desde el punto de vista epidemiológico por la OMS como resistentes a los medicamentos, que incluyen los serotipos bacterianos (según la nomenclatura danesa) 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) la posibilidad de reducir la cantidad de la proteína transportadora en las formulaciones conjugadas completas se está convirtiendo en una cuestión prioritaria.

40 De hecho, se debe considerar que a un niño se le realiza la inmunización con las vacunas conjugadas de *H. influenzae* (un conjugado específico del tipo de tipo b Ps), *N. meningitidis* (cuatro conjugados específicos de grupo del grupo A, C, W135 e Y Ps ) y *S. pneumoniae* (hasta trece conjugados específicos de tipo del tipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F Ps) para la prevención de IPD de amplio espectro, se inyectará con dieciocho antígenos conjugados que tienen la carga relevante de dieciocho veces la dosis única, específica de tipo, de la proteína transportadora. Además, esta dosificación se debe multiplicar por tres o cuatro veces, teniendo en cuenta el hecho de que se necesitan de tres a cuatro dosis de las vacunas para conferir protección completa al niño en los primeros 2 años de edad. Considerando todo, la cantidad total de proteína transportadora inyectada en un niño, fácilmente puede alcanzar dosis de aproximadamente 0,20 mg, al menos en el caso de la proteína CRM197, con un estrés obvio del sistema inmune que, sin embargo, hasta ahora parece tolerar bien tal cantidad de vehículo proteico para conferir la dependencia de las células T auxiliares al huésped. Sin embargo, mediante la mejora continua de la formulación de vacunas polivalentes como la de la prevención de infecciones por *S. pneumoniae*, la cantidad de serotipo Ps, ergo de proteína transportadora, está destinada a aumentar con el tiempo.

50 A este respecto, el autor de la presente invención ha encontrado una nueva categoría de antígenos conjugados que presentan la expresión de múltiples especificidades de hidratos de carbono, predeterminados y construidos en la construcción molecular, que usan un mol (o micromol o nanomol o picomol, todos representativos de una fracción de este) de vehículo proteico para portar al menos un mol (o micromol o nanomol o picomol, todos representativos de una fracción de ello) de cada uno de al menos tres antígenos de carbohidratos específicos de tipo (o grupo) diferentes, por lo tanto, un conjugado que expresa al menos un total de cuatro especificidades serológicas diferentes relacionadas con el antígeno.

55 De esta manera, una formulación de vacuna que abarque hasta dieciocho antígenos conjugados específicos de tipo, como ejemplo, se sintetizará utilizando solo un tercio (o 33%) de la cantidad de proteína transportadora necesaria en

la formulación asociada al antígeno único disponible en la actualidad, de modo que la carga inmunogénica sobre el sistema inmune del huésped será significativamente menor y, por consiguiente, más segura.

De hecho, es bien conocido en inmunología la existencia del fenómeno definido como "supresión inmune dependiente de proteína portadora e interferencia inmune" debido a la regulación negativa del sistema inmune que se ve abrumado por la cantidad de antígeno de proteína administrado en repetidas dosis, por ejemplo, como una entidad conjugada, especialmente cuando están presentes títulos serológicos significativos de anticuerpos IgG de memoria preexistentes, específicos de la proteína transportadora, en el hospedador tratado (Dagan R. et al., *Vaccine* 28 (34): 5513- 5523, 2010). La reducción significativa de la dosificación de vehículo proteico por el presente modelo molecular, sin embargo, garantiza la expresión completa de la dependencia T auxiliar, de acuerdo con el trabajo experimental previo que señala que la respuesta inmune anamnésica de IgG de mamíferos hacia un antígeno glicoconjugado, se restringe a el área de enlace híbrido de los epítomos proteína-carbohidrato con la especificidad de la respuesta inmune limitada a unos pocos residuos de monosacáridos de la estructura de carbohidrato unido covalentemente (Arndt y Porro, *Immunobiology of Proteins and Peptides*, Editado por MZ Atassi, Plenum Press, New York y London, Vol. 303, páginas 129 - 148, 1991).

El documento mencionado anteriormente investiga diferentes estrategias químicas y diferentes MW de las Ps de *S. pneumoniae* conjugadas con la proteína transportadora CRM197 para obtener la estructura óptima del conjugado cuando se usan antígenos de carbohidrato mono funcionalmente activados; también, el artículo investiga el área molecular más probable en la construcción del conjugado que es responsable de la dependencia de T auxiliares en mamíferos (a través del análisis de los anticuerpos policlonales del isotipo IgG) mediante el mapeo molecular de los conjugados sintetizados.

La Pat. U.S. N° 4.711.779, a nombre del mismo solicitante, describe un modelo molecular de glicoproteína trivalente que expresa inmunogenicidad en mamíferos contra una bacteria Gram-positiva y Gram-negativa. El documento se refería a una construcción molecular que usaba oligosacáridos de bajo PM, acoplados covalentemente a la proteína transportadora mediante un derivado enlazador introducido en el grupo reductor terminal descubierto después de la hidrólisis química a baja temperatura; ese conjugado presentó un máximo de tres especificidades diferentes (para la Proteína CRM197, para el tipo Ps 6A, para el grupo Ps C); utilizó oligosacáridos monofuncionales; la construcción molecular indujo especificidad serológica a la proteína transportadora y a cada una de las dos estructuras de carbohidrato transportadas.

La Pat. U.S. N° 5.306.492, también a nombre del mismo solicitante, describe vacunas de conjugados de oligosacáridos y un método mejorado para producir dichas vacunas conjugadas basadas en oligosacáridos. El método implicaba la activación de los haptenos de oligosacáridos a alta temperatura y en el grupo de reducción terminal descubierto antes de ser covalentemente acoplado a la proteína transportadora a través de una molécula de enlace; una especificidad bivalente expresada en un conjugado típico (a la Proteína CRM197 y al tipo (o grupo) -Ps); utilizó oligosacáridos monofuncionales; la construcción molecular indujo especificidad serológica a la proteína transportadora y a la estructura de hidratos de carbono de un solo vehículo.

El documento EP 1501542, en nombre del mismo solicitante, describe un nuevo método para producir antígenos conjugados basados en polisacáridos, reticulados, HMW poli-dispersos con alto rendimiento; un conjugado típico expresó especificidad para el toxoide proteico del tétano y para el tipo (o grupo) Ps transportado; utilizó polisacáridos polifuncionales acoplados a vehículos de proteínas polifuncionales; la construcción molecular indujo especificidad serológica a la proteína transportadora y a la estructura de hidratos de carbono de un solo vehículo.

Además, Porro M. et al. en *Medecine Tropicale*, 43: 129-132, 1983 introdujo por primera vez la química de activación de un oligosacárido meningocócico del grupo B (previamente hidrolizado en condiciones ácidas controladas) en su grupo de reducción terminal, mediante amoniaco y aminación reductiva a baja temperatura (25-37°C); dicho oligosacárido que lleva el grupo amino monofuncional se activó después por el bis-succinimidil éster del ácido adípico y luego se conjugó con los grupos amino de los restos lisina de la proteína transportadora CRM197. El antígeno oligosacárido activado era mono-funcional en el proceso de conjugación y la conjugación se produjo sin la activación previa de la proteína transportadora CRM197. Además, Porro M. et al. en *Molecular Immunology*, 22: 907-919 (1985) describió por primera vez la química de activación de un oligosacárido neumocócico de tipo 6A (previamente hidrolizado en condiciones ácidas controladas) en su grupo de reducción terminal, mediante amoniaco y aminación reductiva en su publicación titulada "Specific antibodies to diphtheria toxin and type 6A pneumococcal capsular polysaccharide induced by a model of semi-synthetic glycoconjugate antigen". Tal oligosacárido vehículo del grupo amino monofuncional se activó a continuación mediante el éster de bis-succinimidilo del ácido adípico y a continuación se conjugó con los grupos amino de los residuos de lisina de la proteína transportadora CRM197. El antígeno de oligosacárido activado fue monofuncional en el proceso de conjugación y sin la activación previa de la proteína transportadora.

En un artículo posterior en *Molecular Immunology*, 23: 385-391, (1986), los mismos autores presentaban un proceso de conjugación en dos etapas con el mismo vehículo proteico CRM197, de dos oligosacáridos capsulares (derivados de bacterias Gram-negativas y Gram-positiva, respectivamente) usando la química de activación y la química de conjugación descrita en los documentos anteriores citados. Ambos antígenos de oligosacáridos activados fueron monofuncionales en el proceso de conjugación y sin la activación previa de la proteína transportadora.

Se observa que el conjugado descrito en dicha publicación implica diferentes oligosacáridos capsulares de bajo PM activados de punto final (concretamente Ps de *Streptococcus pneumoniae* tipo 6A y Ps grupo C de *Neisseria meningitidis*). El uso de dicha activación de punto final proporciona bajos rendimientos de acoplamiento, lo que da como resultado una gran cantidad desproporcionada de proteína transportadora con respecto a la cantidad máxima de las dos estructuras de oligosacáridos transportadas (alrededor de 31,2 µg de CRM197 con 4,8 µg de Ps 6A y 3 µg de Ps tipo C, ver página 387, columna izquierda del documento de 1986 referido anteriormente). Finalmente, en un artículo posterior (Porro M. Editado por R. Bell y G. Torrigiani (Organización Mundial de la Salud), páginas 279-306; John Wiley & Sons Publishers, Nueva York 1987, el autor de la presente invención resume los conceptos y los procedimientos técnicos mencionados anteriormente para los antígenos conjugados compuestos de vehículo proteico y un máximo de dos estructuras de carbohidratos diferentes. Al desarrollar el estado de la técnica anterior, la realización preferida (no limitativa) del constructo molecular básico sujeto de la presente invención está compuesto por una glicoproteína semisintética multivalente, preferiblemente tetravalente, que presenta epítopes múltiples incorporados y expresa su especificidad inmunogénica dependiente de T auxiliares "in vivo" a la proteína CRM197, así como a tres Ps específicas del tipo transportadas, por ejemplo Ps de *S. pneumoniae*. Como ejemplo, cualquier tríada de Ps tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F de *S. pneumoniae*, tales como la tríada que consiste en Ps tipo 3, 6A, 7F, puede conjugarse con la proteína transportadora. Como ejemplo, el término tetravalente se refiere al antígeno de proteína transportadora (que actúa per se como un antígeno y no simplemente como un vehículo) más los tres antígenos Ps transportados.

Por lo tanto, la nueva construcción molecular induce la especificidad serológica a la proteína transportadora y a cada una de las tres estructuras de carbohidrato transportadas.

Este antígeno tetravalente semisintético se puede considerar como el nuevo y novedoso precursor de una nueva generación de antígenos conjugados que expresan múltiples especificidades para obtener vacunas con un espectro de protección siempre más amplio contra una variedad de patógenos bacterianos, al tiempo que reduce drásticamente la cantidad de proteína transportadora, para obtener una mejora racional en:

A) el costo de producción de las vacunas;

B) su eficiencia de producción en términos de mejora del rendimiento de acoplamiento que permitió la síntesis de la glicoproteína con tres (o más) antígenos Ps (también con alto PM);

C) su precisión de producción en términos de determinación cuantitativa desde el punto de vista serológico de la cantidad de Ps unida covalentemente usando el ensayo de inhibición-ELISA específico informado en la presente solicitud, para una cuantificación exacta de los múltiples antígenos de carbohidratos presentes en la construcción molecular descrita, sobre la base de la cuantificación inmunoquímica, en lugar de la química de la técnica anterior citada (véase Porro et al., 1986), especialmente en los diversos casos en los que existen similitudes altamente significativas entre las estructuras de carbohidratos específicos de la especie;

D) su seguridad en relación con la menor cantidad de dosis de proteína que impacta en el sistema inmune de la población diana. De hecho, dicha dosis de proteína es aprox. 30% (alrededor de 10 µg de proteína en la dosis que involucra una formulación entera 15-valente a 2 µg de proteína/tríada/dosis) de la dosis de proteína presente en el conjugado de CRM197 con las dos Ps del artículo de Porro et al., 1986. Tal reducción no sería predecible para la persona experta en tal cantidad en base a la estequiometría disponible informada en el documento en el que una dosis de inmunización contendría al menos 31,2 µg de CRM197; por lo tanto, para una composición multivalente que comprende 13 ó 15 antígenos conjugados, incluso suponiendo la posibilidad de preparar, de acuerdo con la química anterior, el modelo molecular tetravalente múltiple detallado de la invención, la cantidad de proteína CRM197 en la formulación sería  $31,2 \times 15/3 = 156,0$  µg frente a 10 µg del conjugado multivalente de la invención; y, en consecuencia:

E) la utilidad pública de tales vacunas conjugadas.

La presente invención abre nuevos caminos en el campo de la inmunología clínica y la vacunología. De hecho, la antigenicidad múltiple incorporada de la construcción molecular descrita, específica para diferentes antígenos bacterianos, en realidad es paralela, en el campo innovador de la polifarmacología, la síntesis de un fármaco diseñado a priori para alcanzar simultáneamente múltiples receptores de relevancia farmacológica, permitiendo de este modo la reducción del número de fármacos administrados en forma asociada (Besnard J. et al., *Nature*, 492: 215-220, 2012). Por lo tanto, un objeto de la presente invención es una construcción molecular multivalente antigénica que consiste en una unidad básica que comprende una proteína transportadora dependiente de T auxiliares unida covalentemente a un mínimo de tres polisacáridos capsulares de diferente especificidad serológica por un enlazante que comprende un enlace reducido de imina y un enlace de amida, en donde cada polisacárido capsular comprende al menos uno del epítipo antigénico básico repetitivo que consiste en un mínimo de cinco a doce residuos de monosacáridos, preferiblemente un mínimo de ocho a doce restos de monosacáridos, caracterizado porque al menos un mol o fracción del mismo del transportador de proteína lleva al menos un mol o fracción del mismo de cada uno de los al menos tres polisacáridos capsulares diferentes específicos de tipo o específicos de grupo; en donde dicha proteína transportadora dependiente de T auxiliares se selecciona entre el grupo de la proteína CRM197 de mutantes naturales de difteria, toxoide diftérico y toxoide tetánico, proteína D de

Haemophilus influenzae, proteínas neumocócicas de superficie, toxina neumocócica y toxoide tetánico químicamente derivatizado por espaciador de di-hidrazida de ácido adípico.

5 La proteína transportadora dependiente de T de la construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con la invención está unida covalentemente a un mínimo de tres (por ejemplo, tres o cuatro o cinco) estructuras de hidratos de carbono de diferente especificidad serológica hasta el límite de reactividad de los grupos amino nucleofílico de los aminoácidos estructurales, principalmente Lys, pero también, por ejemplo, de las características básicas de Arg e Hys, presentes en la estructura de la proteína transportadora implicada en la reacción de acoplamiento.

De acuerdo con las realizaciones más preferidas de la presente invención, la proteína transportadora es la proteína CRM197 mutante natural de la difteria.

10 Dicha proteína la mostraron por primera vez Uchida y Pappenheimer a mediados de los setenta (Uchida T. y col., J. Biol. Chem. 248, 3838-3844, 1973) y su posible uso como nuevo inmunógeno contra la toxina diftérica, como en una correlación inmunogénica con el toxoide diftérico, ya fue publicado por el solicitante (Porro M. y col., J. Infect. Dis., 142 (5), 716 - 724, 1980). Desde entonces, el solicitante utilizó CRM197 como proteína transportadora dependiente de T auxiliares ideal para antígenos de hidratos de carbono, una vez que se comprendieron las razones de las características inmunogénicas peculiares de este último grupo de antígenos en sujetos humanos, en la edad específica que involucra la maduración del sistema inmune (desde aproximadamente 2 meses hasta alrededor de los 2 años de edad). La proteína CRM197 está compuesta por una secuencia de 535 aminoácidos, al igual que la toxina diftérica (Giannini G. y col., Nucl. Acid Res., 12, 4063-4069, 1984) pero muestra una mutación puntual en el aminoácido en la posición 52, donde Glu reemplaza a Gly. Se ha publicado que su antigenicidad se dirige principalmente a cuatro áreas de la secuencia, cuando se usan anticuerpos monoclonales, concretamente las secuencias AA 1-156, 157-193, 293-345 y 465-535 (Zucker D. y Murphy J. R., Mol. Immunol. 21, 785-793, 1984). La proteína también presenta 39 residuos de Lys y un grupo amino terminal, para un total de 40 grupos amino reactivos, que se usan deliberadamente para las reacciones químicas implicadas en las diversas estrategias de conjugación.

25 La proteína transportadora CRM197 del conjugado de la invención generalmente se prepara usando los clones de *C. diphtheriae* C7 ( $\beta$ 197)<sup>tox</sup> pero también se puede obtener mediante clones de *P. fluorescens*, entre otros.

De acuerdo con las realizaciones preferidas de la construcción molecular multivalente antigénica de la invención, los polisacáridos capsulares transportados se seleccionan entre, pero sin limitación, Ps de *Streptococcus pneumoniae* (tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 11B, 11C, 11F, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23F, 33F, 35B, entre Ps. de *Neisseria meningitidis* (grupo A, C, W135 e Y), *Haemophilus influenzae* (tipo b), *Mycobacterium tuberculosis* y *Klebsiella pneumoniae* (es decir, antígenos K1-K20), *Salmonella typhi* (tipo Vi), *Escherichia Coli* (tipo K1), *Vibrio cholerae* o una combinación de los mismos. Preferiblemente, dicha combinación de Ps se lleva a cabo entre Ps que pertenecen a uno o más agentes infecciosos que causan enfermedades sistémicas y pulmonares (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*) además de Ps pertenecientes a uno o más agentes infecciosos que causan enfermedades intestinales (*Salmonella typhi* (tipo Vi), *Escherichia Coli* (tipo K1), *Vibrio cholerae*) o Ps pertenecientes a otros agentes infecciosos como *Candida albicans* que causan infecciones sistémicas y genitourinarias. En base a las realizaciones anteriores, también es posible preparar constructos moleculares híbridos en los que la proteína transportadora funciona como vector dependiente de T auxiliares para antígenos de *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* y otros antígenos simultáneamente. Estas construcciones moleculares híbridas no existen en la naturaleza ya que la superficie antigénica de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas difiere significativamente entre ellas en términos de arquitectura molecular de la célula bacteriana y los mecanismos biológicos a través de los cuales inducen inmunidad protectora en huéspedes mamíferos. Por ejemplo, mientras que la inmunidad protectora inducida contra Ps capsular de la bacteria Gram-negativa *N. meningitidis* implica actividad bactericida dependiente del complemento, la inducida por la bacteria Gram-positiva *S. pneumoniae* implica actividad opsonofagocítica, pero dependiente del complemento. En el caso de una categoría híbrida de antígenos sintéticos, ambas vías se inducen específicamente (Porro M. y col., *Molecular Immunol.*, 23: 385-391 (1986), una diferencia fundamental que se muestra a partir de las propiedades de cada antígeno natural individual.

50 La presente invención contempla también la asociación del constructo molecular multivalente antigénico de acuerdo con la invención con la clase de vacunas basadas en LPS definidas como endotoxoides. Los endotoxoides son complejos no tóxicos de LPS con SAEP (péptidos anti-endotoxina sintéticos) que se ha demostrado que son útiles en la administración de LPS como inmunógeno a mamíferos (Rustici A. y col., *Science*, 259: 361-365, 1993).

55 Dicha asociación puede contemplar el uso o la administración separada, simultánea o secuencial de la construcción molecular multivalente antigénica y el/los endotoxoides de bacterias gramnegativas. El endotoxoide se puede seleccionar entre endotoxoide B (grupo B de *N. meningitidis*), endotoxoide de *E. coli*, *S. typhi*, *V. cholerae*, *S. enteritidis*, *B. pertussis*.

Las moléculas híbridas de acuerdo con la construcción molecular descrita también pueden incluir el polisacárido capsular de *Mycobacterium tuberculosis*, un patógeno que se expande continuamente en todo el mundo y para el

cual todavía no existe una vacuna "esterilizante"; es decir, una vacuna que sea protectora en el torrente sanguíneo y en los pulmones del huésped. La cápsula de polisacáridos de *M. tuberculosis* consiste predominantemente en un polímero de  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano con ramas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) que muestra similitudes estructurales con el glucógeno citosólico. El  $\alpha$ -glucano micobacteriano tiene una masa molecular aparente de  $1,3 \times 10^7$  y se expresa tanto in vitro como in vivo (Schwebach, J. R., y col., 2002. *Infect. Immun.* 70: 2566 - 2575); también, los antígenos acompañantes como los glicolípidos LAM (Lipoarabinomannan) y PIM (fosfatidilinositol manósido) están posiblemente asociados con la cápsula de polisacárido. Uno o todos estos antígenos de carbohidratos presentes en la capa capsular pueden conjugarse luego a una proteína transportadora como CRM197, como un ejemplo, y convertirse en parte de la construcción molecular de la invención.

10 También es posible prever una construcción molecular multivalente antigénica en la que los polisacáridos capsulares transportados son los pertenecientes a *Mycobacterium bovis* para la prevención de la infección que afecta a otros seres humanos, vacas, cerdos, gatos domésticos, équidos o ganado ovino.

Otro caso en el que la construcción molecular multivalente de la invención se puede aplicar con ventajas sustanciales, en términos de tener un diseño de formulación racional para una nueva vacuna, es el relacionado con las características patógenas del hongo *Candida albicans*. El hongo comensal *Candida albicans* causa candidiasis de la mucosa en pacientes inmunocomprometidos, lo que incluye infecciones orofaríngeas, esofágicas, gastrointestinales y vaginales. La candidiasis vulvovaginal (VVC) y la VVC recurrente antimicótica también son un problema frecuente en mujeres en edad fértil. Ambas infecciones de la mucosa pueden afectar a la calidad de vida y encontrar una nueva vacuna contra las infecciones por *Candida* sería una nueva herramienta importante para prevenir la candidiasis de la mucosa y sería beneficioso para muchos pacientes. Una vacuna sistémica y local efectiva todavía no existe en la prevención de tales infecciones crónicas recurrentes. El repertorio antigénico de *C. albicans* contiene, entre otros, varios antígenos de naturaleza glucídica, a saber, el 1,3- $\beta$ -glucano (Bromuro et al., 2010) y los L-mananos como  $\beta$ -1,2-mannotriosa (Han et al., 2010; Xin et al., 2008). Tales antígenos de carbohidratos estructuralmente diferentes pueden conjugarse todos con una proteína transportadora de elección para preparar una entidad multivalente como la descrita en este documento, que, en cierta medida, puede imitar la estructura antigénica completa, basada en carbohidratos, del patógeno, que, en el caso de infecciones genitourinarias, también puede estar racionalmente asociada con antígenos basados en carbohidratos de *E. coli* en forma conjugada.

Además, otro caso en el que la construcción molecular multivalente de la invención se puede aplicar con ventajas sustanciales en términos de tener un diseño de formulación racional para una nueva vacuna, es el relacionado con las características patogénicas de *Staphylococcus aureus*. Este patógeno, según lo mostrado por O'Riordan y Lee *Clin. Microbiol. Rev.*, 17: 218-234, 2004 y siguientes sintetizados, es un patógeno bacteriano oportunista responsable de un espectro diverso de enfermedades humanas y animales. El estafilococo es también una causa importante de infecciones de heridas y tiene el potencial invasivo de inducir osteomielitis, endocarditis y bacteriemia, lo que lleva a infecciones secundarias en cualquiera de los principales sistemas orgánicos. Las infecciones estafilocócicas ocurren con mayor frecuencia cuando se traspasan las barreras de la piel o de la mucosa, después de la inserción de un cuerpo extraño, y en huéspedes con sistemas inmunes comprometidos. Debido a la prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos y la reciente aparición de aislados clínicos resistentes a la vancomicina, el control de *S. aureus* se ha vuelto cada vez más difícil. El estafilococo juega un papel importante en las infecciones nosocomiales y recientemente ha sido reconocido como una causa importante de infecciones adquiridas en comunidad. Las infecciones de *S. aureus* adquiridas en comunidad a menudo ocurren en individuos sanos que carecen de los factores de riesgo esperados para las infecciones por *S. aureus*, por ejemplo, hospitalización o cirugía reciente, residencia en un centro de cuidado a largo plazo o uso de drogas inyectadas. Entre otros antígenos, el componente bacteriano que afecta principalmente a la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* incluye un polisacárido capsular, que permite que los estafilococos se adhieran a las membranas eucarióticas, resistan a la opsonofagocitosis, lisen las células eucariotas y desencadenen la producción de una cascada de moléculas inmunomoduladoras huésped. Se han descrito cápsulas de al menos 18 cepas de *S. aureus* y al menos cuatro de ellas han sido caracterizadas. Cada una contiene ácidos hexosaminurónicos. Se han realizado caracterizaciones bioquímicas en algunos polisacáridos purificados. La cepa M expresa una cápsula de tipo 1 con la siguiente estructura:  $(\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GalNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GalNAcA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-d-FucNAc-(1}\rightarrow)_n$ ; un residuo de taurina está unido por amida a cada cuarto residuo de d-GalNAcA. Otras dos cepas, D y SA1 mucoide, producen cápsulas que son serológica y bioquímicamente similares a las producidas por la cepa M. La cápsula del serotipo 2 tiene la estructura:  $(\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-d-GlcNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-d-GlcNAcA-(1-alanilo)-(1}\rightarrow)_n$ . Los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8 (CP5 y CP8, respectivamente) son estructuralmente muy similares entre sí y a la cápsula fabricada por la cepa T. El tipo 5 tiene la estructura  $(\rightarrow 4)\text{-}3\text{-O-Ac-}\beta\text{-d-ManNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-1-FucNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-d-FucNAc-(1}\rightarrow)_n$ , y el tipo 8 tiene la estructura  $(\rightarrow 3)\text{-}4\text{-O-Ac-}\beta\text{-d-ManNAcA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-1-FucNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-d-FucNAc-(1}\rightarrow)_n$ . Los polisacáridos de tipo 5 y 8 difieren solo en los enlaces entre los azúcares y en los sitios de O-acetilación de los residuos de ácido aminosaminurónico, aunque son serológicamente distintos.

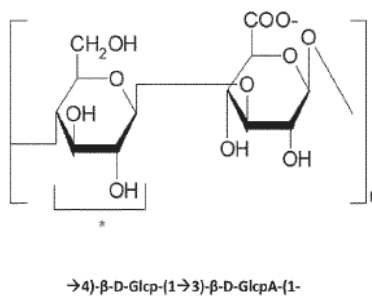
Muy recientemente (Nanra et al., *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9: 3, 480-487, 2013) han mostrado el papel del Ps capsular de *S. aureus* en la prevención de la muerte no específica de OPA (opsonofagocitosis) en presencia de cantidades variables de complemento pero en ausencia de anticuerpos específicos para Ps; en contraste, en presencia de anticuerpos específicos a Ps criados en macacos rhesus por conjugados CRM197-Ps de tipo 5 y 8, la muerte por OPA fue muy eficiente en *S. aureus*, subrayando el papel fundamental de los anticuerpos para la cápsula Ps para provocar las defensas inmunológicas a este patógeno cuando están en forma de cápsula.

De acuerdo con esto, también es objeto de la presente solicitud la formulación innovadora de una vacuna contra *S. aureus*, compuesta de un constructo molecular en forma de glicoconjugado que contiene al menos tres antígenos Ps específicos de tipo diferentes de *S. aureus* en la proteína transportadora de elección, más preferiblemente CRM197.

- 5 De acuerdo con una realización preferida, las estructuras de carbohidrato transportadas de antígenos de *S. pneumoniae* seleccionadas de acuerdo con una realización específica de la invención son los polisacáridos tipo 3, 6A, 7F.

El polisacárido tipo 3 responde a la siguiente estructura (Reeves R. E. y Goebels W. F., J. Biol. Chem., 139: 511 - 519, 1941):

S. Pneumoniae Tipo 3

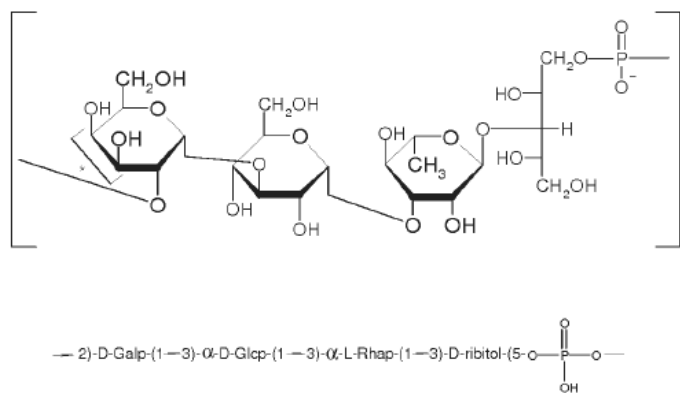


Grupos reactivos:  
\*2,3-hidroxilos

- 10 La estructura presenta un par de grupos -OH/unidad de repetición de base (BRU) lo que significa que existe la posibilidad de activarlo en diversos grados usando el método descrito por el solicitante en la patente EP 1501542 antes mencionada.

El polisacárido tipo 6A responde a la siguiente estructura (Rebers P.A. y Heidelberger M., J. Am. Chem. Soc., 83: 3056-3059, 1961):

S. Pneumoniae Tipo 6A

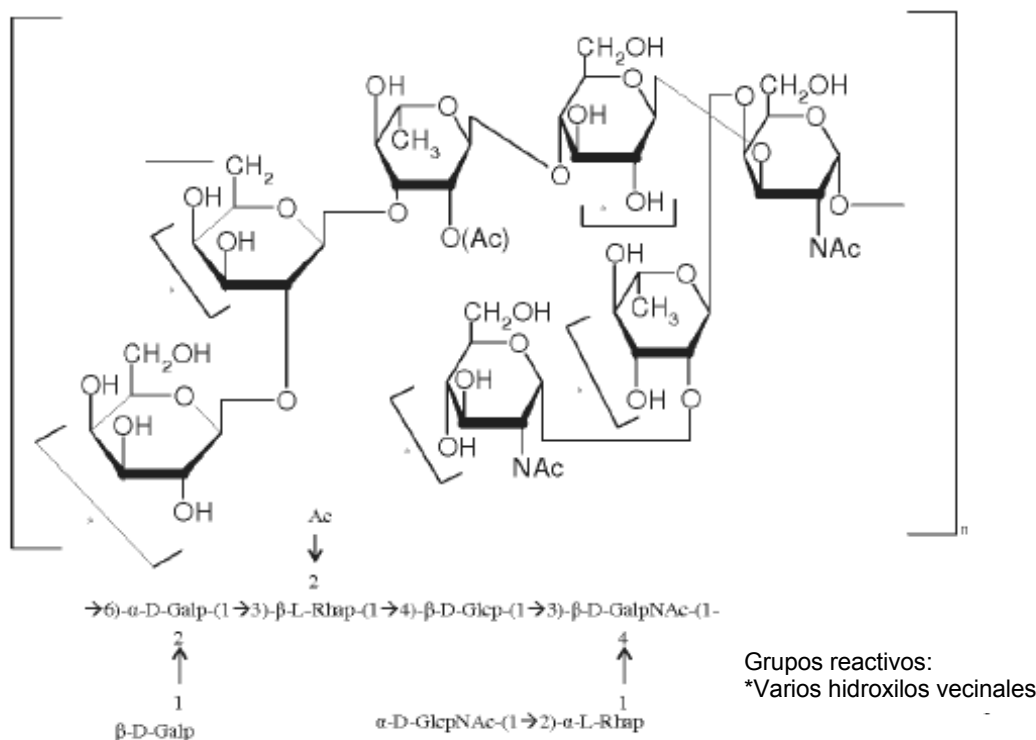


Grupos reactivos:  
\*3,4-hidroxilos

La estructura presenta un par de grupos -OH/unidad de repetición de base (BRU) lo que significa que hay una gran posibilidad de activarlo en diversos grados usando el método descrito por el solicitante en el documento EP 1501542.

5 El polisacárido tipo 7F responde a la siguiente estructura (Moreau M. y col., Carbohydrate Res., 182 (1): 79-99, 1988):

*S. Pneumoniae Tipo 7F*



La estructura presenta bien cinco pares de grupos -OH/unidad de repetición de base (BRU) lo que significa que hay una gran posibilidad de activarla en diversos grados usando el método descrito en el documento EP 1501542.

10 Otros posibles conjugados multivalentes (además o en alternativa a CRM197-3, 6A, 7F) donde la proteína CRM197 (o cualquier otra proteína inmunogénica) sirve como vehículo dependiente de T auxiliares de los polisacáridos de *S. pneumoniae* son seleccionados entre la siguiente configuración no limitativa de tríadas:

CRM197-4,5,9V; CRM197-1,6B, 14; CRM197-18C,19A,23F; CRM197-6C, 19F, 22F; CRM197-12F, 15B, 33F.

No hace falta decir que cualquier combinación (tríada o cuarteto o más) de Ps tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F de *S. pneumoniae* puede contemplarse.

15 De acuerdo con otra realización ejemplar, los conjugados multivalentes de la invención pueden contemplar las siguientes tríadas de Ps: CRM197-3, 6A, 7F; CRM197-5,9V, 19F; CRM197-1,14,19A; CRM197-22F, 23F, 33F; CRM197-4,6B, 18C.

20 La construcción molecular multivalente antigénica de la invención puede estar en forma monomérica o polimérica. La invención también se dirige a una o más de una construcción molecular multivalente antigénica como se definió anteriormente en una vacuna para la protección de un sujeto (preferiblemente perteneciente a la población pediátrica humana) de las infecciones debidas a al menos un agente seleccionado entre *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *S. typhi*, *S. aureus* y *E. coli*. Preferiblemente, la combinación del constructo molecular multivalente antigénico de la invención se llevará a cabo seleccionando el constructo molecular multivalente antigénico que porta Ps perteneciente a uno o más agentes infecciosos que causan enfermedades sistémicas y pulmonares (tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*) además de Ps pertenecientes a uno o más agentes infecciosos causantes de enfermedades intestinales (*Salmonella typhi* (tipo Vi), *Escherichia Coli* (tipo K1, *V. cholerae*) o Ps que se originan de otros agentes infecciosos como el hongo comensal *Candida albicans* que causa infecciones genitourinarias también en asociación con el patógeno *E. coli*.



De hecho, es posible prever una vacuna contra infecciones por *Candida albicans* y *Escherichia coli* (preferiblemente para la inmunización de la población femenina) que comprende una o más construcciones moleculares multivalentes antigénicas en las que las estructuras de carbohidratos portadoras son las pertenecientes a *Candida albicans* y *Escherichia coli*.

- 5 Otro aspecto de la presente invención contempla una vacuna contra infecciones por *Mycobacterium bovis* para la inmunización de bovinos, cerdos, gatos domésticos, équidos o ganado ovino.

Además, la invención presenta una formulación de vacuna que comprende una o más construcciones moleculares de diferentes especificidades antigénicas según la presente invención en un vehículo fisiológicamente aceptable, opcionalmente junto con un adyuvante y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 10 La invención se refiere además a una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro como se definió anteriormente para su uso en el campo médico humano para la protección de un sujeto de las infecciones debidas a al menos un agente seleccionado entre *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *S. typhi*, *E. coli*, *V. cholerae* y *C. albicans*. Preferiblemente, dicho sujeto pertenece a la población pediátrica.

- 15 Además, el modelo molecular descrito en la presente solicitud es la base para una vacuna polivalente de amplio espectro para la prevención de infecciones bacterianas de *S. pneumoniae* de tipo específico que contienen un mínimo de 7 tipos (por ejemplo 9, 12, 15, 18, 21, 24) y hasta 25 estructuras diferentes de carbohidratos de tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18 C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F.

- 20 También es posible prever una vacuna que contemple la combinación de una o más construcciones moleculares antigénicas tetravalentes (que porten tres Ps) de la invención con una construcción antigénica bivalente o trivalente (que lleve uno o dos Ps) o alternativamente con una construcción antigénica pentavalente (que lleve cuatro Ps), cuando el número final de estructuras de hidratos de carbono que la persona experta pretende lograr sea diferente de un múltiplo de tres.

- 25 Cuando se considera el conjugado básico que porta tres moles (o fracciones del mismo) de antígenos de hidratos de carbono estructuralmente diferentes por mol (o fracciones de él) de la proteína transportadora, la cantidad de proteína transportadora se puede reducir a aprox. 30% de la presente en cualquiera de las formulaciones conjugadas neumocócicas disponibles actualmente para la población pediátrica (p. ej.: Prevnar que es el objeto de la patente EP1868645 y Synflorix).

- 30 Un ejemplo práctico de formulación de amplio espectro (por ejemplo: 18-valente) de una vacuna para la prevención de IPD (enfermedad neumocócica invasiva) debido a *S. pneumoniae*, que se basa en la construcción molecular multivalente antigénica descrita en esta solicitud, es la asociación de al menos tres, cuatro, cinco o preferiblemente todos los siguientes conjugados multivalentes, donde la proteína CRM197 (o cualquier otra proteína inmunogénica) sirve como vehículo dependiente de T auxiliares:

- 35 CRM197-3,6A, 7F; CRM197-4,5,9V; CRM197-1,6B, 14; CRM197-18C, 19A, 23F; CRM197-6C, 19F, 22F; CRM197-12F, 15B, 33F. En dicho ejemplo, solo seis conjugados multivalentes cubren el amplio espectro de los serotipos seleccionados.

- 40 En marcado contraste, las formulaciones disponibles en la actualidad requerirían la asociación de dieciocho conjugados. No hace falta decir que puede ser contemplada cualquier combinación (tríada o cuarteto) de Ps tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F de *S. pneumoniae*. Otro ejemplo preferido de formulación de amplio espectro (por ejemplo: 15-valente) de una vacuna para la prevención de IPD (enfermedad neumocócica invasiva) debido a *S. pneumoniae*, comprende conjugados multivalentes de la invención que contemplan las siguientes tríadas de Ps: CRM197-3,6A,7F; CRM197-5,9V,19F; CRM197-1,14,19A; CRM197-22F,23F,33F; CRM197-4,6B,18C.

- 45 La cantidad inyectada de vehículo proteico en la primera formulación es, por lo tanto, aprox. 30% (en peso) de la cantidad de proteína transportadora presente en la última formulación, con una reducción altamente significativa de al menos 70% de la misma (en base al peso).

- 50 Para hacer una comparación, la cantidad total de proteína transportadora actualmente presente en la vacuna "Prevnar" 13-valente (formulación compuesta por 13 antígenos monovalentes asociados, objeto de la patente EP 1868645) es aprox. 32 µg, a la dosis clínica de aprox. 2 µg de proteína/aprox. 2 µg de cada antígeno Ps conjugado, para un total de 31 µg de antígenos Ps [proporción media (R) Proteína/Ps (p/p) = 1,03]; a aproximadamente la misma relación Proteína/tipo-Ps específico (como se muestra por el conjugado multivalente descrito anteriormente CRM197-3,6A,7F), la cantidad total de proteína transportadora en la formulación 18-valente ejemplificada es solo 12 µg o el 37,5% de eso presente en la formulación 13-valente de "Prevnar" (los datos sobre la composición de la vacuna "Prevnar" y la vacuna "Synflorix" provienen de los documentos disponibles al público publicados por US-FDA y EMA).
- 55

Ejemplos adicionales de formulaciones de vacunas se basan en la construcción molecular multivalente antigénica según la invención para la prevención de infecciones bacterianas de *N. meningitidis* específicas de grupo (grupo A, C, W135, Y).

5 La misma estrategia con respecto al proceso de conjugación y los controles, descritos anteriormente para la construcción molecular antigénica multivalente de *S. pneumoniae* tipo 3, 6A y 7F, puede usarse para otras estructuras de carbohidratos como las de *N. meningitidis*.

En este caso, solo un antígeno multivalente que contenga las estructuras de carbohidratos específicas del grupo (polisacárido A, C, W135 e Y) puede constituir la formulación de la vacuna.

10 Por lo tanto, otro objeto de la invención es una formulación de vacuna de amplio espectro para la prevención de la infección debida a *Neisseria meningitidis* que comprende una construcción molecular multivalente antigénica que contiene las estructuras de carbohidratos específicas de grupo A, C, W135 e Y.

15 De acuerdo con una realización preferida, la presente invención se dirige a una formulación de vacuna de amplio espectro para la prevención de la infección pulmonar (preferiblemente en la población pediátrica) debido a más de un agente infeccioso seleccionado entre *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis*, que comprende más de una construcción molecular multivalente antigénica que contiene dichas estructuras de hidratos de carbono específicas de agente. Alternativamente, la presente invención se refiere a una formulación de vacuna de amplio espectro para la prevención de infecciones intestinales (en la población humana pediátrica o adulta) debido a más de un agente infeccioso seleccionado entre *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholera*.

20 Otra realización prevé una formulación de vacuna de amplio espectro para la prevención de infecciones sistémicas o genitourinarias debidas a patógenos como el hongo comensal *C. albicans* y *Escherichia coli*, comprendiendo dicha vacuna más de una construcción molecular multivalente antigénica que contiene dichas estructuras de hidratos de carbono específicas de agente.

25 De acuerdo con una realización particular de la presente invención, las formulaciones de vacuna mencionadas anteriormente se pueden administrar por separado, simultánea o secuencialmente con un antígeno endotoxide de bacterias gram negativas, seleccionándose dicho endotoxide del grupo constituido por endotoxide de *N. meningitidis* grupo B, *E. coli*, *S. typhi*, *V. cholerae*, *S. enteritidis*, *B. pertussis*.

30 Cuando se considera la construcción conjugada básica que porta los cuatro antígenos de carbohidratos estructuralmente diferentes, la cantidad de proteína transportadora puede reducirse a al menos el 25% de la presente en cualquiera de las formulaciones conjugadas asociadas disponibles actualmente (p. ej.: "Menactra" y "Menveo") según los documentos disponibles al público sobre su composición y formulación (un total de 48 y 47 µg/dosis de Toxide de *Difteria* y CRM197, respectivamente) publicados por US-FDA y EMA.

35 La dosis inmunogénica de formulaciones polivalentes de la construcción molecular descrita en esta solicitud se refiere a la dosis de cada estructura de carbohidrato transportada. A este respecto, la dosis puede oscilar entre 0,1 y 10 µg, preferiblemente 1 µg, de cada antígeno de carbohidrato conjugado en bebés y niños. Aquellos que son expertos en el campo clínico ayudarán a encontrar la dosis óptima en la población objetivo.

40 Preferiblemente, dichas formulaciones de vacuna comprenden además un mineral o un adyuvante químicamente sintético o biológico. Pueden usarse adyuvantes minerales o químicamente sintéticos o biológicos con la construcción molecular descrita en esta solicitud con el fin de beneficiarse de cualquier refuerzo inmunológico que pueda ser eficaz para disminuir la dosis inmunogénica óptima en humanos para reducir aún más la cantidad total de proteína transportadora. Particularmente, los adyuvantes inorgánicos preferidos en las formulaciones de vacuna de acuerdo con la invención para uso en seres humanos se seleccionan entre fosfato de aluminio ( $AlPO_4$ ) e hidróxido de aluminio; los adyuvantes orgánicos preferidos se seleccionan de adyuvantes basados en escualeno tales como MF59, QF 21, Addavax; los antígenos bacterianos preferidos se seleccionan entre monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trehalosa (adyuvante de Ribí).

45 En las formulaciones de vacunas para uso en el campo veterinario, se prefiere el adyuvante de Freund (completo o incompleto). La dosis de adyuvante puede oscilar entre 0,1-1 mg/dosis, preferiblemente siendo de 0,5 mg/dosis.

50 Más preferiblemente, dicha formulación es adecuada para la administración por vía subcutánea o intramuscular o intradérmica o transcutánea. Convenientemente, dicha administración puede llevarse a cabo mediante inyección de jeringa convencional o herramientas sin aguja.

Las formulaciones de vacunas de acuerdo con la invención se pueden administrar de acuerdo con un protocolo que requiere administraciones únicas o múltiples, según las instrucciones del médico, pediatra o veterinarias.

55 La presente invención se refiere además a un proceso de conjugación para preparar la construcción molecular multivalente antigénica que emplea la química descrita en la patente EP 1501542, donde cada una de los al menos tres polisacáridos capsulares se activa químicamente a monofuncionalidad o polifuncionalidad por desacoplamiento

de O-des-hidrógeno por oxidación y aminación reductiva formando enlaces reducidos de imina con un espaciador de alquil diamina, luego es derivatizado a ésteres activos, siendo tales estructuras de carbohidratos derivadas de éster acopladas finalmente o simultáneamente o acopladas paso a paso a los grupos amino de la proteína transportadora polifuncional a través de la formación de enlaces amida.

5 en donde dicha proteína transportadora dependiente de T auxiliares se selecciona entre el grupo de mutantes naturales de difteria proteína CRM197, toxoide diftérico y toxoide tetánico, proteína D de Haemophilus influenzae, proteínas neumocócicas de superficie, toxina neumocócica y toxoide tetánico químicamente derivatizado por el espaciador de di-hidrazida del ácido adípico;

10 en el que al menos un mol o fracción del mismo del vehículo proteico se hace reaccionar con al menos un mol o una fracción del mismo de cada uno de los al menos tres diferentes antígenos de carbohidratos específicos de tipo o específicos de grupo.

Preferiblemente, dichos polisacáridos capsulares se activan químicamente en sus correspondientes derivados de diamina-ácido butírico y los ésteres activos son ésteres succinimidílicos.

15 Como ejemplo, la activación química de la tríada de polisacáridos tipo 3, 6A, 7F (o de la otra tríada preferida 4,5,9V; 1,6B, 14; 18C, 19A, 23F; 6C, 19F, 22F; 12F, 15B, 33F; 5, 9V, 19F; 1,14,19A; 22F, 23F, 33F; 4,6B, 18C) de S. pneumoniae al Ps-DAB homólogo (derivado de ácido diaminobutírico) se ha realizado de acuerdo con el proceso descrito por el solicitante en la reivindicación 1 del documento EP 1501542, y la proteína transportadora polifuncional fue CRM197.

20 Alternativamente, el proceso de conjugación para preparar la construcción molecular multivalente antigénica emplea la química descrita en la reivindicación 8 del documento EP 1501542 que implica el acoplamiento simultáneo o el acoplamiento paso a paso de los grupos amino de la proteína transportadora poli-funcional con al menos tres polisacáridos capsulares diferentes, a través de una aminación reductiva que forma un enlace reducido de imina, siendo tales polisacáridos capsulares activados previamente a monofuncionalidad o polifuncionalidad, con o sin espaciadores, mediante desacoplamiento de O-des-hidrógeno mediante oxidación.

25 Como puede inferirse, el modelo molecular descrito anteriormente puede desarrollarse además para contener más de tres (por ejemplo, cuatro o cinco) estructuras de hidratos de carbono diferentes por un solo mol (o fracciones de este) de la proteína transportadora, dependiendo esta posibilidad de tres parámetros principales de la construcción molecular:

30 a) las características físico-químicas de la proteína transportadora, cuya estructura debe contener la mayor cantidad posible de residuos de lisina (fuente de grupos reactivos  $-NH_2$ );

b) los PM polidispersos seleccionados "ad hoc" de las diferentes estructuras de carbohidratos que presentan una tasa de activación óptima al tiempo que limitan los efectos negativos de los fenómenos de impedimento estérico en la reacción de acoplamiento, y

35 c) la eficacia de la química utilizada para la activación de las diferentes estructuras de carbohidratos y para la síntesis de la construcción molecular (la química preferida para una alta eficiencia en la activación óptima de estructuras de carbohidratos es el desacoplamiento de O-des-hidrógeno por oxidación, con o sin espaciador, mientras que para una alta eficiencia en la reacción de conjugación es a través de la formación de enlaces amida a través de ésteres activos entre las estructuras de carbohidratos y la proteína transportadora, también es preferible para la reacción de conjugación, la química que utiliza la formación de un enlace reducido de imina entre las  
40 estructuras oxidadas de carbohidrato desacopladas de O-des-hidrógeno, con o sin espaciadores, y la proteína transportadora, a través de aminación reductiva directa).

El proceso de conjugación empleado de acuerdo con la invención prevé la activación en múltiples etapas de (al menos tres) polisacáridos (que consecuentemente pueden tener indiferentemente, aunque homogéneamente, bajo o alto PM) con el fin de mejorar los rendimientos de acoplamiento con la proteína transportadora. Esto es diferente del  
45 proceso de conjugación de la técnica anterior (véase Porro y col., Molecular Immunology, Vol. 23, páginas 385-391, 1986) que implica la activación del punto final a baja temperatura de los Ps de bajo PM empleados que, en consecuencia, dio como resultado un bajo rendimiento de acoplamiento sin implicar la reticulación molecular del conjugado.

Otra diferencia con el modelo anterior radica en las características estequiométricas de esa construcción previa (relación p/p Proteína/Ps) así como en la determinación de las Ps empleadas que se lleva a cabo mediante inmunoquímica en la presente invención frente al enfoque químico utilizado en la técnica anterior. Esto ha permitido la posibilidad en la presente invención de determinar la cantidad cuantitativa de Ps que tiene estructuras muy similares cuando están presentes en la misma construcción molecular.

55 De acuerdo con una realización preferida de la invención, los polisacáridos capsulares de la etapa a) comprenden al menos uno de los epítopes básicos repetidos según se evalúa mediante Inhibición-ELISA, que consiste en un mínimo de cinco a doce restos monosacáridos según la determinación de la masa molecular y espectroscopia RMN.

Finalmente, la presente invención se dirige a las construcciones moleculares multivalentes antigénicas que se pueden obtener a través de los procesos de conjugación descritos anteriormente.

La presente invención se ilustrará adicionalmente de acuerdo con realizaciones preferidas con referencia particular a las figuras adjuntas, en donde:

5 La Fig. 1 muestra una comparación entre el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de Ps 3 nativo (gris) y Ps 3-DAB activado 50% Ox (negro) de Ps 3 y derivado de Ps3-DAB.

La figura 2 muestra espectros de <sup>1</sup>H-RMN de Ps 3-DAB 50% Ox, con filtros de difusión. Espectro en negro 60% GRAD, espectro en gris 2% GRAD que evalúa la ausencia de DAB libre en el derivado.

10 La Fig. 3 muestra el derivado de Ps 3-DAB, el 50% de Ox, el espectro de <sup>1</sup>H-RMN y la cuantificación de la activación de DAB (2% en base molar).

La Fig. 4 muestra una comparación entre el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de Ps6A nativo (gris) y el derivado de Ps6A-DAB activado 50% Ox (negro).

La Fig. 5 muestra espectros de <sup>1</sup>H-RMN de Ps 6A-DAB 50% Ox, con filtros de difusión. Espectro en negro 60% GRAD, espectro en gris 2% GRAD que evalúa la ausencia de DAB libre en el derivado.

15 La Fig. 6 muestra el derivado de Ps 6A-DAB, el 50% de Ox, el espectro de <sup>1</sup>H-RMN y la cuantificación de la activación de DAB (el 2,3% en base molar).

La figura 7 muestra una comparación entre el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del Ps7F nativo (gris) y el derivado de Ps7F-DAB activado al 10% Ox (negro). La señal a 1,92 ppm, solo presente en el Ps nativo, se debe al ion acetato libre. La señal de OAc a 2,24 ppm permanece igual después de la activación de DAB.

20 La figura 8 muestra espectros de <sup>1</sup>H-RMN de Ps 7F-DAB 10% Ox, con filtros de difusión. Espectro en negro 60% GRAD, espectro en gris 2% GRAD que evalúa la ausencia de DAB libre en el derivado.

La figura 9 muestra el derivado de Ps 7F-DAB 10% de Ox, el espectro <sup>1</sup>H-RMN y la cuantificación de la activación de DAB (1,7% en base molar). La flecha indica la señal de referencia a 5,65 ppm ( $\alpha$ -protón de glucosa o galactosa) para la cuantificación de la activación de DAB.

25 La figura 10 muestra el análisis de GPC del constructo molecular multivalente antigénico CRM197-3, 6A, 7F.

La figura 11 muestra el análisis de GPC de los cuatro componentes recién mezclados (CRM197 + Ps 3-DAB + Ps 6A-DAB + Ps 7F-DAB) para mostrar la ausencia de cualquier cantidad significativa de formación de complejo entre los antígenos individuales.

30 La figura 12 muestra el análisis de SEC-HPLC del antígeno multivalente, después de la purificación en Sepharose 4B-CL, con referencia específica al perfil de la proteína transportadora CRM197.

La figura 13 muestra el análisis SEC-HPLC de CRM197 como proteína nativa, cuando se mezcla con Ps 3-DAB, Ps 6A-DAB y Ps 7F-DAB.

35 La figura 14 muestra el análisis de SDS-PAGE (tampón de glicina al 9%) que muestra el patrón del antígeno multivalente purificado CRM197-3, 6A, 7F. Leyenda de las muestras cargadas: 1: CRM197 como referencia; 2: PM polidisperso del antígeno conjugado multivalente purificado CRM197-3, 6A, 7F; 3: Mezcla de CRM197 + Ps3-DAB + Ps6A-DAB + Ps7F-DAB como referencia.

40 La figura 15 muestra el análisis de inmunotransferencia (Western-blot) del antígeno multivalente como se revela cualitativamente por el anticuerpo policlonal de suero específico de tipo. Leyenda de las muestras cargadas: 1: Conjugado multivalente CRM197-3, 6A, 7F (de la línea 2 de la figura 14, anterior); 2: Mezcla de CRM197 + Ps3-DAB + Ps 6A-DAB + Ps7F-DAB como referencia.

La figura 16 muestra la comparación entre el % de inhibición (expresado como MIC<sub>50</sub>) para CRM197 nativo y en su forma conjugada como CRM197-Ps, 3,6A, 7F.

La figura 17 muestra la curva sigmoïdal (escala logarítmica) referida al gráfico de la figura 16.

45 La figura 18 muestra la comparación entre el % de inhibición (expresado como MIC<sub>50</sub>) de Ps3-DAB y CRM-3,6A,7F frente a Ps3 nativo que muestra la Antigenicidad de Tipo 1 o la Identidad Antigénica de Ps3 después de la activación o conjugación de DAB.

La figura 19 muestra la curva sigmoïdal (escala logarítmica) referida al gráfico de la figura 18.

La figura 20 muestra la comparación entre el % de inhibición (expresado como MIC<sub>50</sub>) de Ps 6A-DAB y CRM-3,6A, 7F frente a Ps 6A nativo que muestra la antigenicidad de tipo 1 o la identidad antigénica de Ps6A después de la activación o conjugación de DAB.

La figura 21 muestra la curva sigmoïdal (escala logarítmica) referida al gráfico de la figura 20.

- 5 La figura 22 muestra la comparación entre el % de inhibición (expresado como MIC<sub>50</sub>) MIC<sub>50</sub> de Ps 7F-DAB y CRM-3,6A, 7F frente a Ps 7F nativo que muestra la antigenicidad de Tipo 1 o la identidad antigénica de Ps7F después de la activación o conjugación de DAB.

La figura 23 muestra la curva sigmoïdal (escala logarítmica) referida al gráfico de la figura 22.

- 10 En la siguiente sección experimental, la invención se describirá con más detalle de acuerdo con las realizaciones preferidas, que se debe considerar que no es limitativa para el alcance de la protección, sino que simplemente tiene fines ilustrativos.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis del antígeno conjugado tetravalente que comprende los polisacáridos 3, 6A, 7F de *S. pneumoniae* y la proteína transportadora CRM197

- 15 Activación química de Ps 3, 6A, 7F al Ps-DAB homólogo (derivado de ácido diaminobutírico)

Esta etapa se ha realizado de acuerdo con el proceso descrito por el solicitante en la reivindicación 1 (paso A1) de la patente EP1501542 mencionada anteriormente, incluida en este documento como referencia.

Los controles específicos de dicha activación, así como las características obtenidas de las estructuras de Ps activadas, se muestran a continuación utilizando la espectroscopía <sup>1</sup>H-RMN.

- 20 Análisis <sup>1</sup>H-RMN de Ps3-DAB, Ps6A-DAB, Ps7F-DAB

#### 1. Solución de derivados de Ps y Ps-DAB para el análisis de RMN

- 25 Se disolvieron 3-4 mg de muestra de polisacárido (PS) o PS-DAB en 0,7 ml de tampón fosfato-D<sub>2</sub>O y se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm. La concentración de tampón de fosfato preparado en D<sub>2</sub>O es 100 mM, pH = 7. Sal sódica del ácido trimetilsililpropiónico (TSPA), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si(CD<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COONa se usa como patrón interno. La concentración de TSPA es 1 mM.

#### 2. Equipo de RMN

Se usa un espectrómetro de RMN de campo alto (600 MHz). Se emplea una cabeza de sonda de alta resolución de 5 mm con bobina de gradiente Z capaz de producir gradientes en la dirección z (paralela al campo magnético) con una fuerza de al menos 55 G · cm<sup>-1</sup>.

- 30 3. Configuración de experimentos de RMN

Después de la introducción de la muestra dentro del imán, se llevaron a cabo todos los procedimientos de rutina: afinación y adaptación, ajuste, calibración de pulso de 90 grados. La presaturación se puede usar para suprimir la señal HDO residual. Para una buena presaturación, el centro del espectro (O1) debe establecerse exactamente en la señal HDO (aproximadamente 4,80 ppm), y también es deseable un buen ajuste.

- 35 Después del ajuste de los parámetros de presaturación, se verifican los parámetros de los experimentos de gradiente de difusión. Se utiliza la secuencia de pulso de eco estimulado utilizando gradientes bipolares con un retardo de la corriente de Foucault longitudinal.

#### 4. Huella digital de la activación DAB

Grupo -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> a 3,08 ppm

- 40 Grupo -CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>- a 3,17 ppm

#### 5. % de Activación DAB en Ps

Está en el valor del intervalo de 0,5-5,0% moles DAB/moles BRU (unidad de repetición básica del Ps específico del grupo) con un intervalo molar óptimo de 1,5-3,0%.

- 45 Derivatización de Ps3-DAB, Ps6A-DAB, Ps7F-DAB a sus ésteres activos homólogos como derivados de Ps-DAB-MSE

Esta etapa se ha realizado de acuerdo con el proceso descrito por el solicitante en la reivindicación 8 de la patente europea EP 1501542, incluida en este documento como referencia.

Acoplamiento simultáneo de las tres Ps activadas (polifuncionales) a la proteína transportadora (poli-funcional) CRM197

5 La síntesis química del conjugado, también conocida como reacción de acoplamiento, se ha realizado de acuerdo con el proceso descrito por el solicitante en la reivindicación 8 de la patente europea EP1501542 incluida en este documento como referencia.

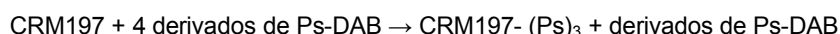
10 El procedimiento, sin embargo, se puede considerar en este documento como innovador porque las tres reacciones de acoplamiento se ejecutan simultáneamente, en lugar de proceder en una reacción de acoplamiento en el momento (o un proceso paso a paso).

15 Este procedimiento puede preferirse al acoplamiento paso a paso de cada antígeno activado por Ps por la simple razón de acortar el tiempo de reacción, mejorando por lo tanto la eficacia de la reacción, siempre que los tres Ps activados estén en la condición para competir comparativamente en el equilibrio por la reacción de acoplamiento (esta característica incluye un PM promedio comparable, intervalo comparable de la activación de Ps-DAB y relaciones estequiométricas comparables entre los grupos de reacción de la proteína y los de las Ps activadas).

La estequiometría de reacción apropiada tiene en cuenta la cantidad total de ésteres de succinimidilo con respecto a los tres antígenos PS activados y los grupos amino de la proteína transportadora disponibles.

20 La estequiometría se establece preferentemente para considerar la reactividad de no más del 20% (u 8 de 40) de los grupos amino disponibles en la estructura de CRM197 (como ejemplo) para que la proteína conserve óptimamente su repertorio antigénico.

En base a los datos experimentales, la reacción de acoplamiento es consistente con la siguiente estequiometría:



25 Donde la entidad Ps-DAB-derivados se refiere al total de partes iguales de cada una de las tres estructuras de carbohidratos específicas de tipo en la reacción, produciendo un conjugado con un promedio de 1 mol de proteína para el total de 3 moles de Ps de tipo específico transportados, más el exceso debido de derivados de Ps-DAB, según lo regido por la constante de equilibrio:

$$\text{K}_{\text{eq}} = \frac{[\text{CRM197-(DAB-Ps)}_3][\text{Ps-DAB-derivados}]}{[\text{CRM197}][\text{Ps-DAB-derivados}]^4} = \frac{[\text{CRM197-(DAB-Ps)}_3]}{[\text{CRM197}][\text{Ps-DAB-derivados}]^3}$$

30 La ecuación química proporciona evidencias de la glicosilación completa de la proteína transportadora CRM197. La ecuación también muestra que la reacción de conjugación depende de las concentraciones de ambos reactivos, el nucleófilo (CRM197 a través de los grupos epsilon-NH<sub>2</sub> de sus residuos Lys) y el electrófilo (el resto carbonilo de los grupos éster del derivado de Ps-DAB) por lo tanto, se define como la reacción de S<sub>N</sub>2.

35 Las consideraciones anteriores son consistentes con la observación experimental de que el rendimiento más alto en la reacción de glucosilación obtenida con CRM197 como proteína transportadora ha sido el 100% de la proteína transportadora y aproximadamente el 80% (p/p) de los Ps-DAB-derivados presentes en la reacción, siendo la parte restante de ellos una baja cantidad de Ps-derivados desacoplados necesarios para empujar hacia el lado derecho el equilibrio.

40 En este tipo de reacciones, el disolvente afecta a la velocidad de reacción porque los disolventes pueden o no rodear al nucleófilo, lo que dificulta o no su aproximación al átomo de carbono. Los disolventes apróticos polares, en general, son mejores disolventes para esta reacción que los disolventes próticos polares porque los disolventes próticos polares se solvatarán mediante el enlace de hidrógeno del disolvente para el nucleófilo y, por lo tanto, impedirán el ataque al carbono con el grupo saliente. Un disolvente aprótico polar con baja constante dieléctrica o un extremo dipolo bloqueado favorecerá la manera S<sub>N</sub>2 de la reacción de sustitución nucleófila (los ejemplos preferidos son: DMSO, DMF, tetrahidrofurano, etc.). Sin embargo, en el presente caso usando CRM197 como proteína transportadora, los disolventes próticos polares y los disolventes apróticos polares funcionarán muy bien cuando se comparen experimentalmente vis-à-vis.

50 La temperatura de la reacción, que afecta a la K<sub>eq</sub>, es la más baja compatible con el uso del disolvente elegido, al considerar que la reacción es espontánea (por lo tanto, es exotérmica) y, por lo tanto, se establece generalmente entre una temperatura de 4° y 20°C.

Además de la química de conjugación anteriormente detallada, se pueden usar otras químicas para lograr la síntesis del antígeno conjugado multivalente; entre ellos, el acoplamiento directo de la proteína (a través de la aminación

reductiva) a las Ps oxidadas (a través del desacoplamiento de O-des-hidrógeno) o el uso de enlaces heterólogos y químicamente complementarios que pueden servir para activar las Ps y la proteína.

5 También, además de la estrategia de usar productos químicos que conducen a la obtención de conjugados de proteína-Ps reticulados multivalentes a través de la poli-funcionalidad de la proteína y la de los componentes Ps, se puede considerar la síntesis de la construcción molecular multivalente antigénica descrita actualmente como basada en oligosacáridos activados en su grupo de reducción terminal para luego acoplarse a la proteína transportadora, como el solicitante mostró anteriormente en otro modelo de antígeno conjugado en el documento mencionado anteriormente Porro M. et al. en Molecular Immunology, 23: 385-391, 1986, adjunto en este documento como referencia.

10 Finalmente, la construcción molecular descrita podría pensarse que se prepara mediante glicosilación enzimática en células bacterianas o de levadura u otras células vivas modificadas por ingeniería genética, usando técnicas de ADN recombinante "ad hoc".

Ejemplo 2: Análisis físico-químico de la construcción molecular multivalente antigénica CRM197-3, 6A, 7F

15 El análisis GPC (cromatografía de permeación en gel) se ha empleado para realizar el análisis físico de la construcción molecular multivalente antigénica del ejemplo 1. La figura 10 muestra el análisis de GPC del antígeno multivalente tal como se obtiene a partir de la reacción de conjugación, antes de la purificación. El cromatograma proviene de Sepharose 4B-CL equilibrada en NaCl 0,14 M tamponada a pH = 7,50. La purificación del antígeno multivalente se obtiene simplemente recogiendo y agrupando las fracciones eluidas de Kd = 0,00 a Kd = 0,30.

20 La técnica de SEC-MALLS ayuda a definir la dispersidad (Đ) del sistema molecular obtenido, calculado mediante la ecuación  $\bar{D} = M_w/M_n$ , donde  $M_w$  es la masa molar promedio en masa y  $M_n$  es la masa molar promedio en número y también permite determinar algunas propiedades intrínsecas del sistema molecular anterior, dado que la intensidad de los ángulos de dispersión de la luz lleva información sobre la masa molar, mientras que la dependencia angular lleva información sobre el tamaño de la macromolécula. De hecho, si una determinada macromolécula de masa M está compuesta de elementos  $m_i$ , entonces la ecuación de dispersión de luz básica muestra que:

25 
$$\langle r_g^2 \rangle = \frac{\sum_i r_i^2 m_i}{\sum_i m_i} = \frac{1}{M} \sum_i r_i^2 m_i$$

donde  $r_i$  es la distancia del elemento  $m_i$  del centro de masa de la molécula de la masa total M. Según esta ecuación, se define la relación entre la masa, el tamaño y las cantidades medidas.

La siguiente Tabla 1 muestra la caracterización de la masa molecular dispersada del antígeno multivalente purificado anterior (fracciones en el intervalo Kd = 0,00-0,30) analizado por SEC-MALLS.

30 Tabla 1

Masa superior	Masa promedio	Masa inferior
(g/mol)	(g/mol)	(g/mol)
$5,92 \times 10^6$	$9,67 \times 10^5$	$2,69 \times 10^5$
(66,4%)	(26,6%)	(7,0%)

35 Los datos experimentales recogidos por SEC-MALLS muestran que la masa dispersa de la construcción molecular multivalente antigénica abarca la unidad básica [CRM197-3,6A, 7F]<sub>n=1</sub> para aproximadamente el 7% de la dispersión de masa, y polímeros de la misma con la composición [CRM197-3,6A, 7F]<sub>n=3,6</sub>, para aproximadamente el 27% de la dispersión de masa, y hasta [CRM197-3,6A, 7F]<sub>n=22</sub> para el resto de la dispersión de masa que representa la forma principal (66%) de la construcción molecular en términos de producto de reacción. Los polímeros de la unidad básica de la construcción molecular se obtienen como entidades moleculares reticuladas debido a la polifuncionalidad de los antígenos Ps (alrededor del 2% de la activación de DAB, en base molar, como se muestra por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN) y la polifuncionalidad de la proteína transportadora (40 grupos amino reactivos/mol, disponible como 39 restos de Lisina + 1 amino terminal aa dentro de la estructura que abarca los 535 aa totales de la secuencia).

45 La figura 11 muestra el análisis de GPC, como un ejemplo, en el mismo gel Sepharose 4B-CL de los cuatro componentes recién mezclados (CRM197 + Ps 3-DAB + Ps 6A-DAB + Ps 7F-DAB) para mostrar la ausencia de cualquier cantidad significativa de formación de complejo entre los antígenos individuales. Los métodos químicos para la titulación de las tres estructuras Ps implicaron el análisis de ácido urónico (tipo 3), fósforo (tipo 6A) y hexosaminas (tipo 7F) de acuerdo con los requisitos de las directrices de la OMS.

La siguiente Tabla 2 muestra la caracterización de las masas moleculares dispersas de los tres derivados de Ps-DAB específicos de tipo mixto analizados por SEC-MALLS, como referencia.

Tabla 2

Masa superior	Masa promedio	Masa inferior
(g/mol)	(g/mol)	(g/mol)
$2,75 \times 10^5$	$7,27 \times 10^4$	$1,81 \times 10^4$
(17,0%)	(70,5%)	(12,5%)
Teniendo en cuenta los diferentes BRU de las tres estructuras Ps, el número promedio $\pm$ SD de BRU/Ps es $112 \pm 62$		

5 La Fig. 12 muestra el análisis de SEC-HPLC del antígeno multivalente, después de la purificación en Sepharose 4B-CL, con referencia específica al perfil de la proteína transportadora CRM197.

Las siguientes condiciones experimentales se usaron en el análisis SEC-HPLC:

Columna: Phenomenex, Biosep-SEC-S3000, 300  $\times$  7,80 mm (Vo 6,92 min.; Vt 12,5 min.)

Intervalo de tamaños PM: 700 K-5 K

10 Eluyente: NaCl 0,14 M + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M, pH 6,80

Flujo: 1 ml/min

Detector: 280 nm (detección de la proteína CRM197)

15 La figura 13 muestra el análisis SEC-HPLC de CRM197 como proteína nativa, cuando se mezcla con Ps 3-DAB, Ps 6A-DAB y Ps 7F-DAB. Las condiciones experimentales son las mismas que las descritas anteriormente para el análisis llevado a cabo en la figura 12.

20 A la luz de lo anterior, el conjugado en análisis es una entidad molecular polidispersa, de monomérica a polimérica, que contiene la unidad básica de la construcción molecular mostrada en la ecuación química [CRM197-(Ps)<sub>3</sub>], con un PM medio calculado de aprox.  $2,7 \times 10^5$  cuando se considera el PM promedio (estimado por SEC-MALLS) de las estructuras Ps activadas por DAB polifuncionales (aprox.  $0,7 \times 10^5$ ) y la de CRM197 ( $5,85 \times 10^4$ ) representando 535 aa); en consecuencia, las diversas unidades reticuladas de dicha estructura básica están alcanzando un PM de aprox. 6 millones según lo evaluado por SEC-MALLS. La relación p/p entre la proteína transportadora y cada una de las tres Ps de tipo específica es aprox. 1,0; esta relación p/p produce una relación molar promedio (R) de proteína/Ps de tipo específico de 1,0, que corresponde a una proporción promedio de un mol de proteína/mol de Ps específico de tipo, como también lo sugiere la ecuación química.

25 En consecuencia, la entidad molecular reticulada obtenida experimentalmente responde a un modelo molecular constituido por varias unidades poliméricas de la unidad básica que consiste simplemente en un mol de proteína transportadora que lleva un total de tres moles de Ps de tipo específico (un mol por cada Ps específico de tipo).

Ejemplo 3: Análisis inmunoquímico de la construcción molecular antigénica multivalente CRM197-3,6A, 7F

30 El análisis inmunoquímico del constructo molecular multivalente antigénico CRM197-3, 6A, 7F se llevó a cabo mediante SDS-PAGE usando las condiciones analíticas de acuerdo con Laemmli U. K., Nature 227, 680-685 (1970), adjunto en este documento como referencia.

La figura 14 muestra el análisis de SDS-PAGE (tampón de glicina al 9%) que muestra el patrón del antígeno multivalente purificado.

35 La figura 15 muestra el análisis de inmunotransferencia (Western-blot) del antígeno multivalente como se muestra cualitativamente por el anticuerpo policlonal de suero específico de tipo. Las condiciones analíticas empleadas fueron según Towbin H. et al., PNAS 76: 4350-4354 (1979). Tinción de plata según Porro M. et al., Anal. Biochem. 118: 301-306 (1981). Los anticuerpos policlonales en suero, Ps específicos de tipo, se describen en la sección a continuación dedicada al método de inhibición-ELISA.

40 Determinación cualitativa y cuantitativa de cada componente de Ps antigénico sobre la base de inhibición-ELISA utilizando anticuerpos policlonales (o monoclonales)

Como es bien conocido desde el nacimiento de la Inmunoquímica, la rama del campo más amplio de la Inmunología en los años treinta del siglo pasado, los antígenos capsulares Ps están compuestos de unidades repetitivas básicas



(BRU) que pueden estar constituidas por monosacáridos homólogos (p. ej., Ps meningocócico) así como por secuencias de hetero-polisacáridos más complejas que implican residuos bi/tri/tetra/penta/hexa/hepta-sacáridos (por ejemplo, Ps neumocócico). Una secuencia promedio de 5 (preferiblemente 8) a 12 restos de monosacáridos forman el epítipo estructural básico de antígenos de carbohidratos (Ps), que confiere la especificidad inmunológica debida a cada estructura (Ps). Este tamaño, típico de un epítipo único dentro del sistema ABO humano o de una secuencia de estructuras epitópicas repetitivas dentro de Ps capsulares bacterianos complejos, es coherente con el tamaño del sitio de unión de un anticuerpo (Kabat E.A., "The nature of an antigenic determinant", J. Immunol. 97: 1-11, 1966) y, sobre esta base, fue posible describir la reactividad de una estructura Ps hacia una población policlonal específica de anticuerpos, al inhibir la reacción de unión del sistema Ps-Ab utilizando diferentes PM del sistema polidisperso de Ps, con el fin de documentar la relación existente entre antigenicidad de una estructura Ps que contiene BRU repetido (formando así epítopos repetidos de antigenicidad idéntica) y la especificidad para ello del antisuero policlonal homólogo (Porro M. et al. , Mol. Immunol. 22: 907-919, 1985); por comparación de la MIC<sub>50</sub> de los diversos PM de la polidispersión de un Ps dado, fue posible definir la especificidad relativa de una población policlonal (o monoclonal) de anticuerpos para dicho PM y finalmente calcular la concentración relativa de las diferentes estructuras de Ps para una determinación cuantitativa de ello.

Al tener un método inmunoquímico confiable para mapear y calificar las estructuras Ps presentes en tal construcción molecular, existen ventajas prácticas de determinar las características cualitativas y cuantitativas de dicho modelo de conjugados, respecto a los métodos químicos, especialmente en los casos de Ps con características estructurales muy cercanas para sus secuencias, como en el caso de los tipos 6A y 6B o tipos 19A y 19F o en cualquier otro caso donde existan similitudes estructurales entre los antígenos Ps como en el caso de Ps específicos de tipo pertenecientes a un grupo de referencia dado (p. ej., el Grupo 6 incluye los Ps específicos de tipo 6A, 6B, 6C, 6D, el Grupo 19 incluye los Ps específicos de tipo 19A, 19B, 19C, 19F, el Grupo 23 incluye los Ps específicos de tipo 23A, 23B, 23F). De hecho, la exquisita especificidad de un anticuerpo puede discriminar fácilmente entre semejantes similitudes estructurales sin ambigüedad y en poco tiempo, a diferencia de los métodos químicos.

El desarrollo reciente de anticuerpos monoclonales frente a antígenos Ps de *S. pneumoniae* (Pride M. W. et al., Clin. And Vaccine Immunol. 19(8): 1131-1141, 2012) aumentaría aún más el potencial de este poderoso método de análisis.

La comparación entre la titulación química y la titulación inmunoquímica de antígenos de carbohidratos para probar su equivalencia cuantitativa se realiza mediante el uso de inhibición-ELISA, a través del parámetro MIC<sub>50</sub> determinado experimentalmente (inhibidor mínimo).

Concentración del antígeno carbohidrato seleccionado que actúa como inhibidor de la reacción homóloga de referencia Ps-Ab) con el fin de evaluar la exactitud y precisión del método inmunoquímico con respecto al químico en el control analítico de tal tipo de construcción molecular.

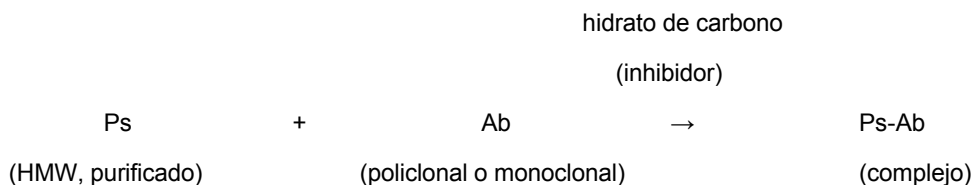
#### Protocolo Inhibición-ELISA

Se aplicó el siguiente protocolo de ELISA para determinar el valor de MIC<sub>50</sub> de cada uno de los tres derivados de Ps-DAB y la proteína CRM197 o el conjugado multivalente CRM197-3, 6A, 7F como inhibidores de la reacción de referencia homóloga Polisacárido-Anticuerpo específico de tipo (Ps-Ab) o Proteína-Anticuerpo (Prot-Ab).

El derivado de Ps específico de tipo de referencia (Ps-DAB) y el conjugado multivalente CRM197-3, 6A, 7F se prepararon de acuerdo con el proceso mencionado presentado por Porro M. en la reivindicación 8 de la patente EP1501542.

Los métodos químicos para la titulación de las tres estructuras de Ps implican el análisis de ácido urónico (tipo 3), fósforo (tipo 6A) y hexosaminas (tipo 7F) de acuerdo con los requisitos de las directrices de la OMS.

La reacción de inhibición se basa en el principio para una estructura de carbohidrato dada, de una masa molecular dada, para inhibir el sistema de reacción de referencia homólogo de acuerdo con la ecuación inmunoquímica:



De modo que la diferencia en reactividad entre la reacción de referencia y la inhibida es representativa para la especificidad diferente o idéntica de la población de anticuerpos para el inhibidor. Mediante el uso de estructuras de carbohidratos de diferente masa molecular, se puede describir la curva sigmoideal típica de esa reacción específica y calcular la MIC<sub>50</sub> del inhibidor para luego compararla con la de la estructura de carbohidratos de referencia y establecer el parámetro de antigenicidad del inhibidor (en una base cualitativa) y especificidad del anticuerpo (en

## ES 2 671 953 T3

una base cuantitativa). Todos estos conceptos y el uso práctico relativo se muestran en las siguientes publicaciones, incorporadas en este documento como referencia:

- Berzofsky J. A. y Schechter A. N. Mol. Immunol., 18: 751 - 763 (1981);
- Porro M. et al. Mol. Immunol., 22: 907 - 919 (1985).

### 5 Método de análisis (ilustrativo)

Soluciones madre:

- Ps-DAB o CRM197 a 1 mg/ml en PBS, pH 7,2-7,4 o PBS 1x (1 L)

- 8,0 g NaCl
- 0,31 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 10 • 2,06 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,16 g KCl
- Sin ajuste del pH

- TBS-Brij al 0,1% (v/v)

◦TBS 10x (11)

- 15 • 80 g NaCl
- 1,6 g KCl
- 0,94 g Tris
- 14,56 g Tris-HCl
- 33 ml Brij-35 (30% v/v)
- 20 • Estable a temperatura ambiente durante 12 meses
- Diluir 50 ml de tampón en 500ml agua MilliQuf

- PBS-Tween20 0,05% (v/v)
- IgG o IgM anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa
- Tampón fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0

- 25 •  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v)
- O-fenilendiamina 1 mg/ml en tampón fosfato-citrato 0,05M, pH 5.0
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M

Procedimiento:

1. Recubrir las placas (placa de poliestireno GREINER 65001 SIGMA cod. M4436)

- 30 - Ps a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de PBS, pH 7,4, 37°C, 2 h + o.n. 4° C.
- CRM197 a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de PBS, pH 7,4 o.n. 4° C.
- Cubrir 100  $\mu\text{l}$ /pocillo

2. Lavar 5x con TBS-Brij 0,1% (v/v) (1er. lavado 20 s)

3. Antisuero policlonal de referencia neumocócico del Statens Serum Institute, Copenhagen, DK ([www.ssi.dk](http://www.ssi.dk)) en PBS-Tween al 0,05% (v/v) 2 h, 37°C. Diluciones finales (como ejemplos):

- a. Antisuero de conejo para el grupo 3 1:100.000 v/v (Positivo ~ 1,0 OD<sub>490nm</sub>)
- b. Antisuero de conejo para el grupo 6A1:25.000 v/v (Positivo ~ 1,0 OD<sub>490nm</sub>)

c. Antisuero de conejo para el grupo 7F 1:800.000 v/v (Positivo ~ 1,0 OD490<sub>nm</sub>)

4. Muestras desconocidas: las muestras desconocidas se interpolan frente a la curva de regresión sigmoidea de referencia obtenida por la reacción de referencia.

5. anti-CRM197 de suero murino, dilución final, 1:100.000 v/v (Positivo ~ 1,0 OD490<sub>nm</sub>).

5

Tabla 3

Inhibidor final/pocillo	Solución madre de inhibidor										Solución madre de anti-PS		
	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml			
0,5 ng/ml	50 µl											50 µl	
5 ng/ml		50 µl										50 µl	
50 ng/ml			50 µl									50 µl	
0,5 µg/ml				50 µl								50 µl	
5 µg/ml					50 µl							50 µl	
50 µg/ml						50 µl						50 µl	
100 µg/ml							50 µl					50 µl	
200 µg/ml								50 µl				50 µl	
500 µg/ml									50 µl			50 µl	
1 mg/ml										50 µl		50 µl	

## ES 2 671 953 T3

6. Incubación × Tiempo de inhibición: 15 min
7. Lavado 5x con TBS-Brij 0,1% (v/v) (1er. lavado 20 s)
8. IgG anti-conejo o anti-ratón de cabra marcada con peroxidasa en PBS-Tween al 0,05% (v/v) 2 h 37°C.
9. Lavado 5x con TBS-Brij 0,1% (v/v) (1er. lavado 20 s)
- 5 10. O-fenilendiamina 1 mg/ml en tampón fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% (v/v)
11. Después de 5' detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M 50 µl/pozo
12. Leer a OD 490 nm
13. Interpolarse los valores desconocidos frente a la regresión de la línea sigmoideal de referencia obtenida por la reacción de referencia:

10 Cálculo del % de inhibición:

$$\frac{\text{Valor OD inhibido} - \text{Valor OD control}}{\text{Valor OD positivo} - \text{Valor OD control}} \times 100 = (\%)$$

Por lo tanto, % inhibido = 100 - (%)

Cálculo de MIC<sub>50</sub>:

15 Esta concentración inhibitoria se determina al 50% de la función de regresión o la curva sigmoideal relacionada. La SD del método está dentro del 20% del valor promedio.

Resultados

20 Los resultados de la MIC<sub>50</sub> para CRM197 nativo y en su forma conjugada como CRM197-Ps, 3,6A, 7F muestran que la reacción de conjugación no afectó a las características antigénicas de CRM197 (Identidad antigénica de tipo 1), como puede deducirse del análisis de los gráficos expuestos en la Fig. 16-17. La Fig. 17 ilustra la función de regresión no lineal de la curva sigmoideal.

Los resultados de la MIC<sub>50</sub> para cada uno de los tres derivados de Ps-DAB conjugados se ilustran en los gráficos expuestos en las Figs. 18-23. Las Figs. 19, 21 y 23 ilustran la función de regresión no lineal de la curva sigmoideal.

Ejemplo 4: Determinación de la concentración para el antígeno de carbohidratos en forma conjugada activada o multivalente: comparación de la titulación química vs. valoración inmunoquímica

25 Los títulos inmunoquímicos se obtienen de acuerdo con el método presentado anteriormente en el Ejemplo 3 dedicado al método de Inhibición-ELISA; los títulos químicos se obtienen de acuerdo con los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 2; los títulos inmunoquímicos de muestras desconocidas de cada uno de los tres antígenos específicos de carbohidratos, ya sea en forma activada o conjugada, se determinaron mediante interpolación en la parte lineal de una curva estándar de referencia construida mediante inhibición-ELISA usando la cantidad de antígeno de carbohidrato conocido químicamente. Los valores mostrados son la media de varios ensayos independientes. Los resultados sobre la determinación de la equivalencia cuantitativa de los dos métodos se resumen en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

	Determinación química (µg/ml)	Determinación inmunoquímica* (µg/ml)
Ps1	1,0	0,9 (- 10,0%)
	2,0	2,3 (+ 13,1%)
	4,0	3,7 (- 7,5%)
* Menor cantidad de Ps1 detectada: 0,02 µg		
Ps3	0,80	0,91 (+ 13,4%)
	1,60	1,77 (+ 10,6%)

ES 2 671 953 T3

Determinación química (µg/ml)	Determinación inmunoquímica* (µg/ml)
3,20	3,31 (+ 3,4%)
6,40	6,71 (+ 4,8%)
*Menor cantidad de Ps3 detectada: 0,01 ug	
Ps4	2,0
	2,25 (+ 11,2%)
	4,0
	3,80 (- 5,0%)
	8,0
	7,40 (- 7,5%)
*Menor cantidad de Ps4 detectada: 0,01 ug	
Ps5	3,1
	3,3 (+ 6,1%)
	6,25
	5,7 (- 8,8%)
	12,5
	10,8 (- 13,6%)
*Menor cantidad de Ps5 detectada: 0,015 ug	
Ps6A	0,63
	0,60 (- 4,8%)
	1,72
	1,92 (+ 11,6%)
	3,43
	3,63 (+ 5,8 %)
	6,87
	7,31 (+ 6,4%)
*Menor cantidad de Ps6A detectada: 0,01 ug	
Ps6B	2,0
	2,4 (+ 16,7%)
	4,0
	4,3 (+ 7,0%)
	8,0
	9,2 (+ 13,0%)
*Menor cantidad de Ps6B detectada: 0,10 ug	
Ps7F	1,34
	1,43 (+ 6,7%)
	2,68
	3,00 (+ 11,9%)
	5,37
	5,47 (+ 1,9%)
	10,75
	11,07 (+ 3,0%)
*Menor cantidad de Ps7F detectada: 0,01 ug	
Ps9V	3,8
	4,2 (+ 9,6%)
	7,5
	6,4 (- 15,0%)
	15,0
	12,2 (- 18,7%)
*Menor cantidad de Ps9V detectada: 0,10 ug	
Ps14	3,4
	3,8 (+ 10,6%)
	6,8
	6,5 (- 5,0%)
	13,5
	16,2 (+ 16,5%)
*Menor cantidad de Ps14 detectada: 0,10 ug	
Ps18C	2,5
	2,8 (+ 10,8%)
	5,0
	4,7 (- 6,0%)

## ES 2 671 953 T3

Determinación química (µg/ml)	Determinación inmunoquímica* (µg/ml)
10,0	8,9 (- 11,0%)
*Menor cantidad de Ps18C detectada: 0,02 ug	
Ps19A	4,1 (+ 8,7%)
3,8	6,5 (- 13,4%)
7,5	13,3 (- 11,4%)
15,0	
*Menor cantidad de Ps19A detectada: 0,02 ug	
Ps19F	3,5 (- 7,9%)
3,8	8,3 (+ 9,4%)
7,5	17,0 (+ 11,8%)
15,0	
*Menor cantidad de Ps19F detectada: 0,02 ug	
Ps23F	4,3 (+ 11,7%)
3,8	6,6 (- 12,0%)
7,5	13,3 (- 11,4%)
15,0	
*Menor cantidad de Ps23F detectada: 0,02 ug	
CRM197	1,2 (- 7,7%)
1,3	2,7 (+ 11,7%)
2,5	5,3 (+ 5,7%)
5,0	9,6 (- 4,0%)
10,0	
*Menor cantidad de CRM197 detectada: 0,10 ug	
*Menor cantidad detectable inmunoquímicamente para el Ps de tipo específico en las condiciones del ensayo.	

Nota: La determinación físico-química de la proteína CRM197 se realizó por análisis de reactivo de Folin y/o aminoácidos usando HPLC de fase inversa hidrófoba para separar los aminoácidos marcados con fluoresceína después de la hidrólisis ácida (método Pico-Tag por Millipore). La SD para las determinaciones físico-químicas está dentro del 10% de los valores medios; SD para las determinaciones inmunoquímicas está dentro del 20% de los valores medios, que está dentro de la SD estimada de la variación diaria del método ELISA y de acuerdo con las directrices de la Farmacopea Europea 5ª Edición (2008) para el Vacuna Conjugada de Polisacáridos Pneumocócicos.

5 La misma metodología descrita para el análisis inmunoquímico cualitativo y cuantitativo de cada constructo molecular descrito anteriormente, se utiliza luego para la caracterización de la formulación final de la vacuna polivalente que contiene la asociación de varios (4 ó 5 ó 6 ó más) constructos moleculares para obtener la caracterización completa de una vacuna 12-valente, 15-valente o 18-valente ejemplificativa.

Ejemplo 5: Análisis inmunológico en un modelo murino de la construcción molecular multivalente antigénica, como ejemplo

15 Formulación de vacunas

Proteína media de relación/cada una de las Ps específicas de tipo:  $1,1 \pm 0,1$  (p/p).

Dosis de la construcción molecular CRM197-3,6A, 7F

20 La dosis inyectada es de 0,01 µg y 0,1 µg de cada Ps conjugada específica de tipo, con y sin AlPO<sub>4</sub> como adyuvante a la dosis fija de 0,5 mg/dosis (equivalente a aprox. 0,120 mg de alumbre). La adsorción de la construcción molecular multivalente al adyuvante mineral se produjo a  $\geq 80\%$ , en peso, según se estimó por ELISA. De acuerdo con la estequiometría del conjugado multivalente, la dosis total de CRM197 es de aprox. 0,01 µg en el caso de la

dosis más baja de cada Ps conjugado específico de tipo y aprox. 0,1 µg en el caso de la dosis más alta de cada Ps conjugado específico de tipo.

5 Se destaca que la dosis inyectada de 0,01 µg de Ps específico de tipo es la más baja, inmunogénica en ratones, que se reconoce por la USA-FDA y EMEA para las vacunas conjugadas neumocócicas actualmente autorizadas, que usan fosfato de aluminio como adyuvante.

Animales

Cada grupo de animales contiene 10 ratones hembra Balb/c (alternativamente CD1) y 6 conejos blancos hembra de Nueva Zelanda.

Ruta

10 i.p. (ratones) y s.c. (conejos)

Programa de inmunización

0, 2, 4 semanas; extracción de sangre en la semana 0, 2, 4, 6 (ratones). 0,4 semanas; extracción de sangre en la semana 0, 4, 6 (conejos).

15 La inmunización de control con antígenos Ps simples se omitió sobre la base del conocimiento histórico de que los antígenos Ps altamente purificados no son significativamente inmunogénicos en mamíferos y no "estimulan" los anticuerpos isotipo IgG después de inyecciones repetidas de los mismos.

Títulos de ELISA

20 Títulos expresados como reacción de punto final que muestran OD  $\geq$  2,0 en relación a las reacciones de control para cada Ps específico de tipo y CRM197 o DT (toxide diftérico), el antígeno inmunogénicamente idéntico y en correlación estadística con CRM197 (Porro M. y col. J. Infect. Dis., 142 (5), 716 - 724, 1980). Las diluciones del grupo de suero se realizan en serie, en dos modalidades, a partir de la dilución 1/200.

MOPA (ensayo de funcionalidad)

25 Para probar la actividad opsonica de los anticuerpos policlonales murinos y de conejo generados después de la inmunización con la construcción molecular multivalente, se realizó la prueba MOPA-4 (ensayo de muerte Fagocítica Multiplexada Opsono 4 veces), tal como recomiendan las directrices de la OMS, usando células HL60. Títulos expresados como media geométrica de la dilución de punto final que muestra  $\geq$  50% de actividad de muerte para cada grupo de sueros en cada dosis, como se refiere a una curva estándar construida en paralelo para calcular los valores de título de las diversas muestras por interpolación lineal.

Resultados inmunológicos

30 Dosis de 0,01 µg de Ps/Ps conjugado de tipo específico. Títulos medios geométricos de IgG o IgM para Ps específicos del tipo o para CRM197 en el conjunto de sueros murinos tal como se determina mediante ELISA. SD está dentro del  $\pm$  25% de la media geométrica mostrada. Los títulos de MOPA se muestran entre paréntesis según se calcula mediante interpolación lineal en el procedimiento de ensayo. A menos que se indique lo contrario, la significación estadística entre los títulos de los sueros (determinada por la prueba t) fue  $<0,01$ . Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5

Ag	Sin adyuvante				Con adyuvante			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
3	<200	<200	200	800	<200 <200	200 <200	800 <200 (12)	3.200 <200 (124)
6A	<200	<200	200	800	<200 <200	200 <200	400 <200 (6)	3.200 <200 (135)

Ag	Sin adyuvante				Con adyuvante			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
7F	<200	<200	200	800	<200 <200	200 <200	1.600 200 (26)	6.400 400 (248)
CRM197	<200	<200	800	3.200	<200 <200	1.600 <200	12.800 800	25.600 800

5 Dosis de 0,10 µg/Ps conjugado de tipo específico. Títulos medios geométricos de IgG o IgM para Ps de tipo específico o DT en el conjunto de sueros murinos según lo determinado por ELISA. SD está dentro del ± 25% de la media geométrica mostrada. Los títulos de MOPA se muestran entre paréntesis según se calcula mediante interpolación lineal en el procedimiento de ensayo. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6

Tipo Ps	Sin adyuvante				Con adyuvante			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
3	<200	200	800	6.400	<200 <200	800 <200 (16)	6.400 400 (254)	25.600 800 (1.824)
6A	<200	200	800	3.200	<200 <200	800 200 (22)	3.200 200 (120)	12.500 800 (1.150)
7F	<200	200	1.600	3.200	<200 <200	1.600 200 (48)	6.400 400 (168)	25.600 800 (1.580)
CRM197	<200	800	3.200	12.800	<200 <200	6.400 200	25.600 800	102.400 1.600

Las Tablas 5 y 6 anteriores muestran la inducción anamnésica de anticuerpos de isotipo de IgG biológicamente funcionales para cada uno de los cuatro componentes de la construcción molecular multivalente.

10 Particularmente, se observa en paralelo cualquier actividad potenciadora sobre el sistema inmune observado para la proteína transportadora para cada uno de los antígenos Ps transportados, comportamiento típico y bien conocido de antígenos dependientes de T auxiliares. El efecto del adyuvante mineral es particularmente evidente a dosis tan bajas del antígeno multivalente, otra característica de los antígenos dependientes de T auxiliares como las proteínas que generan una respuesta inmune más fuerte aprovechando más el antígeno de liberación lenta a lo largo del tiempo en el cuerpo del huésped.

Además, el efecto de la glicosilación sobre la proteína transportadora CRM197, como se conoce generalmente para las glicoproteínas, puede ser beneficioso para la resistencia mejorada de esta proteína frente a enzimas proteolíticas, ya que CRM197 es una proteína frágil cuando se expone a las serina proteasas ampliamente presentes en mamíferos (Porro M. y col., J. Infect. Dis., 142 (5), 716 - 724, 1980).

20 El efecto del refuerzo obtenido contra CRM197 también apoya fuertemente el hecho de que la construcción molecular multivalente tiene el potencial de funcionar como antígeno en seres humanos para la prevención de la toxicidad debida a la toxina diftérica, una propiedad bien documentada de CRM197 en modelos animales (véase la referencia bibliográfica anterior), en cuyo caso el antígeno multivalente también podría usarse para la inmunización



de lactantes y niños pequeños en reemplazo de la vacuna del toxoide diftérico (presente en la vacuna DTP) para que la carga antigénica de las vacunas pediátricas en uso pudiera reducirse aún más. Finalmente, de acuerdo con las características inmunológicas de los antígenos dependientes de T auxiliares, el anticuerpo isotipo IgM no se indujo significativamente ni se reforzó por la proteína transportadora o las Ps transportadas de la construcción molecular multivalente.

Los sueros de conejo se usaron específicamente para evaluar el aumento cuádruple de los títulos de ELISA de anticuerpos de isotipo de IgG para Ps específicos de tipo, con el aumento paralelo de los títulos de OPA, después de la primera dosis de refuerzo de la construcción molecular. Se recogieron los siguientes resultados, expresados como el aumento en veces de los sueros GMT obtenidos con respecto a los títulos detectados después de la dosis de sensibilización inmunológica y se muestran en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7

Tipo Ps	Ab IgG frente a Ps (aumento en veces)	OPA frente a Ps (aumento en veces)
3	12	40
6A	18	48
7F	28	52

Ejemplo 6: Formulación de vacuna de una vacuna de conjugado meningocócico cuadrivalente (QMCV) y de una vacuna de conjugado polivalente de neumococo de hasta 25-valente (PPCV)

La composición/formulación de QMCV puede estar limitada a una sola construcción molecular en la que un mol de proteína transportadora (o fracciones de la misma) porta al menos un mol (o fracciones de la misma) de cada una de las cuatro estructuras de hidratos de carbono diferentes. La cantidad ponderada relacionada del antígeno multivalente depende del PM seleccionado de las estructuras de carbohidratos activadas que pueden variar de haptenos de LMW constituidos por unos pocos residuos de monosacáridos (8-12) o BRU (unidades de repetición básicas) que abarcan los epítopes básicos respectivos [Porro M. et al. *Molecular Immunology*, 22: 907 - 919 (1985); Porro M. et al. *Molecular Immunology*, 23: 385-391 (1986)] y hasta las estructuras de hidratos de carbono HMW compuestas de 200 BRU o más para contener la estructura repetida del epítipo básico.

En tal caso, la cantidad de proteína transportadora por dosis humana puede reducirse a al menos un 25% de la cantidad presente en una formulación que usa la asociación de conjugados únicos, específicos de grupo.

La composición de PPCV depende de su formulación polivalente. Por ejemplo, para una vacuna 15-valente que contenga 15 serotipos seleccionados o para una vacuna 18-valente que contenga 18 serotipos seleccionados, como se consideró anteriormente, solo se necesitarán de cinco a seis entidades del constructo molecular antigénico multivalente, ya que en cada uno de ellos un mol de proteína transportadora (o fracciones de ella) transportará un promedio de un mol (o fracciones de la misma) de cada una de las tres estructuras de carbohidratos específicas de tipo diferentes. La cantidad ponderada relacionada del antígeno multivalente depende del PM seleccionado de las estructuras de carbohidrato activadas que puede variar de haptenos de LMW constituidos por unas pocas BRU (unidades de repetición básica) que abarcan los epítopes respectivos (Arndt B. y Porro M. en: *Immunobiology of Proteins and Peptides*, editado por M.Z. Atassi, Plenum Press, Nueva York y Londres, páginas 129-148, 1991) y hasta estructuras de carbohidratos HMW compuestas de 200 BRU o más para contener la estructura repetitiva del epítipo básico. En cualquier caso, la cantidad de proteína transportadora por dosis humana puede reducirse a al menos un 30% de la cantidad presente en una formulación que usa la asociación de conjugados únicos específicos de tipo.

Los nuevos serotipos emergentes de *S. pneumoniae* de acuerdo con los datos disponibles al público sobre epidemiología y resistencia a antibióticos son del tipo 6C, 6D (Satzke C. y col., *J. Clin. Microbiol.*, 48 (11): 4298, 2010; Yao K H y otros, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 70 (3): 291-8, 2011); los serogrupos 11 (tipo 11A, 11B, 11C, 11F) (Richter S. y col., *Clin. Infect. Dis.*, 48: 23-33, 2009); Calix J. J. y col. *J. Bacteriol.* 193: 5271 - 5278, 2011); serogrupo 15 (tipo 15B y tipo 15C); tipo 23A, serogrupos 33 (33F) y 35 (tipo 35B) (Swanson D., IDSA meeting, Boston, 2011); dicho antígeno Ps podría incluirse probablemente en una formulación de vacuna de amplio espectro actualizada adicional preparada de acuerdo con la construcción molecular descrita en la presente solicitud.

Mientras que la vacuna 13-valente actualmente autorizada cubre aproximadamente el 61% de la DPI en niños menores de 5 años, una formulación actualizada que contenga los Ps de los nuevos tipos emergentes de *S. pneumoniae*, podría elevar la barra en la cobertura a 75-80%; de hecho, se ha estimado que una formulación que contiene los tipos 23-valentes de Ps hoy presentes en la vacuna basada en polisacáridos, representa el 88% de las enfermedades neumocócicas bacteriémicas que luego reaccionan de forma cruzada con tipos de Ps causando un 8% adicional de la enfermedad debido a *S. pneumoniae* (fuente Centro de Estados Unidos para el Control de Enfermedades: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Este tipo de formulaciones actualizadas, muy amplias, se puede preparar de forma

segura mediante el uso de construcciones moleculares de la presente invención, que permite un uso reducido de un transportador proteico para transportar dicho número aumentado de antígenos Ps. Por ejemplo, cuando se considera la dosis de 2 µg de CRM197 (similar a la composición Pevnar)/construcción molecular, seis construcciones moleculares que contienen antígenos 18 Ps contendrían una cantidad total de 12 µg de proteína, que es aprox. 40% del presente en la vacuna Pevnar 13-valente, compuesta de conjugados únicos de cada antígeno Ps específico de tipo. Como se hace referencia específica a una formulación ejemplificada de PPCV que contiene una formulación 15-valente que incluye hoy en día los polisacáridos capsulares específicos de tipo más importantes epidemiológicamente significativos de *S. pneumoniae*, las siguientes construcciones moleculares se han sintetizado y analizado como una ejemplificación extendida de la realizaciones preferidas, de acuerdo con los métodos mostrados anteriormente en el Ejemplo 1, 2 y 3 para la construcción molecular CRM197-3, 6A, 7F. La cantidad total de proteína transportadora ejemplificada en esta vacuna 15-valente ilustrada preparada y formulada según los procedimientos mostrados en esta solicitud y definidos por la estequiometría de las cinco construcciones moleculares resultantes, expresando cada una epitopes múltiples incorporados, es coherente con la siguiente composición molar con relación a la dosis de cada construcción molecular que contiene aprox. 1 µg de proteína transportadora CRM197 (PM = 58,5 K) y aprox. 1 µg de cada uno de los tres antígenos polisacáridos específicos del tipo activados por DAB seleccionados (PM promedio = 70,0 K según dos criterios de análisis diferentes, es decir, estimación del tamaño por filtración molecular en membranas filtrantes calibradas y estimación del tamaño por SEC-MALLS, en todos los casos usando moléculas de carbohidrato de referencia como Dextranos de varios PM).

Tabla 8

Construcción molecular	Proporción promedio (p/p) CRM197/Ps	Proporción Molar Relación CRM197/Ps*
CRM197-3, 6A, 7F	CRM197/Ps3 = 1,20	1,44
	CRM197/Ps6A = 0,98	1,17
	CRM197/Ps7F = 1,09	1,30
CRM197-5, 9V, 19F	CRM197/Ps5 = 1,03	1,23
	CRM197/Ps9V = 0,93	1,11
	CRM197/Ps19F = 1,05	1,26
CRM197-1, 14, 19A	CRM197/Ps1 = 1,19	1,42
	CRM197/Ps14 = 0,97	1,16
	CRM197/Ps19A = 0,92	1,10
CRM197-22F, 23F, 33F	CRM197/Ps22F = 1,00	1,20
	CRM197/Ps23F = 1,14	1,37
	CRM197/Ps33F = 1,11	1,32
CRM197-4, 6B, 18C	CRM197/Ps4 = 1,18	1,41
	CRM197/Ps6B = 1,19	1,42
	CRM197/Ps18C = 1,08	1,20

En las construcciones moleculares ejemplificadas, la media de la relación (p/p) proteína/ Ps específico de tipo es:  $1,07 \pm 0,097$  (9,1%) correspondiente a la media de la relación (mol/mol):  $1,27 \pm 0,12$ .

En el caso que la proteína transportadora seleccionada sea CRM197 y el PM promedio de cada antígeno Ps sea el doble del valor mostrado anteriormente, o 140 K, la relación molar de proteína para cada Ps aumenta a un promedio de 2,5; en contraste, cuando el promedio de PM de cada antígeno Ps es la mitad del valor reportado anteriormente, o 35 K, la relación molar de proteína para cada Ps disminuye a un promedio de 0,64.

El concepto de calcular y comparar las características de los antígenos conjugados en base molar es fundamental porque el sistema inmune procesa los antígenos en base molar, como lo hace la naturaleza en cada reacción química o bioquímica de materia transformante, por lo tanto, se refiere al PM del antígeno. Por consiguiente, dependiendo del PM medio de cada antígeno Ps específico de tipo y de la proteína transportadora, las relaciones molares de antígenos conjugados están sujetas a cambios mediante la selección de sus componentes de antígeno.

5 Se prefiere principalmente que las relaciones molares entre la proteína transportadora y cada antígeno Ps específico de tipo sea igual o mayor que 1,0 para una expresión óptima probable de dependencia de T auxiliar. Además de este parámetro molar, también es importante tener en cuenta la cantidad media de enlaces covalentes interpuestos entre la proteína y cada antígeno de carbohidrato específico del tipo, que es paralelo a la tasa de activación del polisacárido específico del tipo, ya que esta región híbrida molecular es la única sugerida experimentalmente como responsable de las propiedades dependientes de T auxiliare de una molécula conjugada (Arndt y Porro, 1991).

10 De acuerdo con las consideraciones anteriores, otra forma de cambiar la estequiometría y, por lo tanto, la relación molar entre los componentes (la proteína transportadora y cada uno de los antígenos de carbohidratos transportados) de la construcción molecular, sin cambiar el PM promedio de los antígenos Ps seleccionados, es el que se refiere al siguiente modelo molecular ejemplificado. Este modelo se sintetizó en virtud de una estequiometría modificada en los reactivos de la reacción química anterior, a favor del componente proteico que estaba presente en la reacción en la relación inversa (p/p) de la reacción mostrada en la ecuación química anterior, con cada uno de los antígenos activados Ps, con el fin de evidenciar la flexibilidad de dicha reacción química que también puede conducir a un producto que muestre la relación molar entre la proteína transportadora y los antígenos Ps transportados a favor del componente anterior. Cuando se hace referencia a la dosis de vacuna relacionada con la estequiometría de este constructo molecular ejemplificado, todavía contiene aprox. 1,0 µg de proteína transportadora CRM197 (PM = 58,5 K) pero solo aprox. 0,3 µg de cada uno de los tres antígenos de polisacárido específicos de tipo activados por DAB seleccionados (PM promedio = 70,0 K).

Tabla 9

Construcción molecular	Proporción promedio (p/p)	
	CRM197/Ps	Proporción molar promedio CRM197/Ps
CRM197-3, 6A, 7F	CRM197/Ps3 = 2,85	3,41
	CRM197/Ps6A = 3,15	3,77
	CRM197/Ps7F = 2,70	3,22
CRM197-5, 9V, 19F	CRM197/Ps5 = 3,20	3,82
	CRM197/Ps9V = 2,90	3,47
	CRM197/Ps19F = 3,47	4,15
CRM197-1, 14, 19A	CRM197/Ps1 = 2,87	3,43
	CRM197/Ps14 = 3,15	3,77
	CRM197/Ps19A = 3,45	4,13
CRM197-22F, 23F, 33F	CRM197/Ps22F = 3,25	3,89
	CRM197/Ps23F = 2,80	3,35
	CRM197/Ps33F = 3,05	3,64
CRM197-4, 6B, 18C	CRM197/Ps4 = 2,90	3,47
	CRM197/Ps6B = 3,41	4,07
	CRM197/Ps18C = 3,10	3,71

20 En las construcciones moleculares ejemplificadas, la media de la relación proteína/Ps (p/p) específica de tipo específico es:  $3,08 \pm 0,24$  (7,8%) correspondiente a la media de la relación (mol/mol):  $3,69 \pm 0,29$ .

25 Los ejemplos anteriores evidencian que las estequiometrías de síntesis diferentes, abordadas por la cantidad de reactivos que participan en el equilibrio químico mostrado en la ecuación química anterior, pueden conducir a una construcción molecular de diferente estequiometría, donde la cantidad de proteína transportadora dependiente de T auxiliar en la construcción molecular se puede seleccionar óptimamente según la expresión óptima de inmunogenicidad de dicha construcción molecular en los diversos grupos de edad de la población humana. En ambas formulaciones 15-valentes, arriba ejemplificadas, que contienen cinco construcciones moleculares que llevan cada una tres Ps específicas de tipo, la cantidad total de proteína transportadora CRM197 es de aprox. 5 µg, mientras que las Ps específicos del tipo conjugadas están en la cantidad de aprox. 1,0 y aprox. 0,3 µg, respectivamente. Por lo tanto, a la dosis de CRM197 equivalente a la presente en la vacuna Prevnar para cada Ps

conjugada específica de tipo, aprox. 2 µg/dosis, la cantidad total de CRM197 en este documento ejemplificada en las formulaciones 15-valentes sería de aprox. 10 µg o aproximadamente 33% de la cantidad total presente en la dosis de la vacuna Prevnar 13-valente. Incluso en la hipótesis de una formulación 23-valente de una vacuna conjugada que utilizaría el modelo molecular mostrado en este documento, a una cantidad comparable de proteína/dosis, la cantidad total de proteína transportadora sería significativamente menor (aproximadamente el 50%) de la cantidad presente en las vacunas 13-valente o 15-valente mostradas en el presente documento, formuladas por asociación de antígenos conjugados específicos de tipo único separados.

De acuerdo con esto, el propósito de las realizaciones descritas anteriormente es proporcionar evidencias del hecho de que la construcción molecular antigénica multivalente descrita con epítomos incorporados se puede sintetizar en una amplia gama de parámetros estequiométricos para luego definir adecuadamente, en mamíferos hospedadores, la dosis óptima del constructo incluso cuando se consideran que se inmunizan los diferentes grupos de edad mediante una formulación de vacuna de amplio espectro. Puede ser en este caso importante recordar que estudios clínicos anteriores habían demostrado que, en adultos y niños pequeños, el sistema inmune no podía discriminar, en términos de inmunogenicidad, entre diferentes tamaños de Ps conjugados a la proteína transportadora CRM197 así como también entre modelos de conjugados de puntos múltiples (entrecruzados) o mono puntos (no entrecruzados) (Eby R. et al., en: Modern Approaches to New Vaccines, CSH Ed., 119-123, 1994) a pesar de que tales estudios no están disponibles públicamente para bebés en el rango de 2-24 meses de edad.

Ejemplo 7: Construcción molecular multivalente con epítomos incorporados basados en la proteína transportadora del toxoide tetánico

Además de la proteína transportadora CRM197, pueden usarse otras proteínas transportadoras dependientes de T auxiliares bien establecidas en una formulación polivalente que considera la construcción molecular descrita en esta solicitud. Como ejemplo, el solicitante ha considerado en este documento el toxoide tetánico (TT) como una proteína transportadora, un inmunógeno universal utilizado de forma segura en la inmunización pediátrica desde hace muchas décadas. A diferencia de la proteína transportadora CRM197, TT nunca se ha formulado en una vacuna conjugada de 13 ó 15 valencias, por lo que la seguridad de dicha vacuna potencial de dosis elevadas de proteínas en los seres humanos queda por establecerse. Por consiguiente, el uso de la construcción molecular multivalente descrita para una proteína como TT representa un enfoque racional para limitar la cantidad de proteína transportadora en una formulación posible de 13 ó 15 valencias (o más) basada en dicha proteína transportadora dependiente de T auxiliar.

TT es un derivado de la toxina homóloga, tratada químicamente por tener la toxina deliberadamente destoxificada para un uso del inmunógeno en humanos. El PM del toxoide purificado es bastante comparable al de la toxina, que es  $1,51 \times 10^5$ , que abarca 1.375 aminoácidos. Sin embargo, entre otras características, la marcada diferencia entre el toxoide y la toxina reside en la cantidad de grupos amino primarios residuales de los residuos de lisina que permanecen en la estructura del toxoide después de la desintoxicación química. Un promedio de 50 grupos amino reactivos están a punto de ser detectados en el toxoide o aproximadamente el 50% de los originalmente presentes en la estructura de la toxina, que funcionan como grupos nucleofílicos en la reacción de acoplamiento con los Ps bacterianos activados. Cuando se compara la estructura de TT con la de CRM197 en términos de capacidad para competir en la reacción de acoplamiento como reactivo nucleofílico, se puede determinar que TT tiene aprox. 50 grupos amino/mol (PM =  $1,51 \times 10^5$  por 1.375 aa) mientras que CRM197 tiene 40 grupos amino/mol (PM =  $58,5 \times 10^4$  por 535 aa), por lo que la densidad molar de ellos (que se define como "actividad nucleofílica molar") es 3,6% en TT y 7,5% en CRM197, mostrando una capacidad mucho más alta de la última proteína para servir como reactivo nucleofílico en una reacción de acoplamiento dada. Sin embargo, dada la diferencia significativa en el PM de las dos proteínas (básicamente un factor = 2,6 a favor de TT) las relaciones molares de la proteína transportadora, para cada uno de los antígenos de carbohidratos transportados seleccionados en los constructos moleculares, puede resultar ventajoso para TT cuando se desea limitar la cantidad de proteína transportadora/dosis en una formulación polivalente. De hecho, a dosis de peso comparables de las dos proteínas transportadoras, TT da como resultado que es 2,6 veces menor que CRM197 en base molar. En contraste, se debe prestar atención al hecho de que su PM puede limitar la posibilidad de obtener una relación molar TT/Ps específico de tipo con un valor  $\geq 1,0$  para la inducción óptima de la dependencia de T auxiliar en el sistema inmune del huésped.

A continuación, el solicitante informa sobre las características físico-químicas de tal construcción molecular utilizando TT como proteína transportadora, sintetizada de acuerdo con el método anterior utilizada para la construcción molecular basada en CRM197, con una estequiometría en los reactivos que permite la glicosilación completa de la proteína transportadora. Dicha construcción molecular se puede considerar como el componente básico para una formulación polivalente basada en la proteína transportadora TT:

Tabla 10

Construcción molecular	Proporción promedio (p/p) TT/Ps	Proporción molar promedio TT/Ps
TT-6A, 9V, 23F	TT/Ps 6A = 2,08	0,96
	TT/Ps 9V = 1,90	0,90
	TT/Ps 23F = 2,15	1,00

5 En el caso de conjugados multivalentes de Ps de *N. meningitidis* y Ps de *H. influenzae*, como ejemplos adicionales, a continuación se muestra una comparación entre las proteínas transportadoras CRM197 y TT destacando la relevancia de la proteína transportadora en las diferentes construcciones (sintetizadas de acuerdo con diferentes estequiometrías según lo permitido por la ecuación química general anterior), relacionadas con su PM en la definición de la relación molar (proteína/Ps), al considerar la proteína y Ps los valores del PM arriba mencionados en las Tablas 8-9:

Tabla 11

Construcción molecular	Proporción promedio (p/p)	Proporción molar promedio
	TT/Ps o CRM/Ps	TT/Ps o CRM/Ps
TT-A, C, Hib	TT/PsA = 1,79	0,83
	TT/PsC = 2,05	0,95
	TT/PsHib = 1,91	0,89
CRM197-A, C, Hib	CRM197/PsA = 2,18	2,60
	CRM197/PsC = 1,87	2,24
	CRM197/PsHib = 1,95	2,33
CRM197-A, C, W135, Y	CRM197/PsA = 0,78	0,93
	CRM197/PsC = 0,97	1,16
	CRM197/PsW135 = 0,75	0,90
	CRM197/PsY = 0,88	1,05

10

Bibliografía

Arndt and Porro, *Immunobiology of Proteins and Peptides*, Edited by M.Z. Atassi, Plenum Press, New York and London, pages 129-148, 1991.

Berzofsky J.A. and Schechter A.N. *Mol. Immunol.*, 18: 751-763, 1981.

15 Besnard J. et al., *Nature*, 492: 215-220, 2012.

Bromuro, C., et al. (2010). *Vaccine* 28, 2615-2623.

Calix J. J. et al. *J.Bacteriol.* 193:5271-5278, 2011.

Dagan R. et al., *Vaccine* 28 (34): 5513-5523, 2010.

Eby R. et al., *Modern Approaches to New Vaccines*, CSH Eds., 119-123, 1994.

20 Patente europea EP 1868645.

Patente europea EP 1501542.

Farmacopea europea 5ª Edición (2008).

Giannini G. et al., *Nucl. Acid Res.*, 12, 4063-4069, 1984.

- Han, Y. et al. (2000). *Infect. Immun.* 68, 1649-1654.
- Kabat E.A., *J. Immunol.* 97: 1-11, 1966.
- Laemmli U.K., *Nature* 227, 680-685, 1970.
- Moreau M. et al., *Carbohydrate Res.*, 182(1):79-99, 1988.
- 5 Nanra J.S. et al., *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9:3, 480-487, 2013.
- O'Riordan K. and Lee J.C., *Clin. Microbiol. Rev.*, 17: 218-234, 2004.
- Porro M. et al., *J. Infect. Dis.*, 142 (5), 716-724, 1980.
- Porro M. et al., *Anal. Biochem.* 118: 301-306, 1981.
- Porro M. et al. *Medecine Tropicale*, 43: 129-132, 1983.
- 10 Porro M. et al. *Molecular Immunology*, 22: 907-919, 1985.
- Porro M. et al. *Molecular Immunology*, 23: 385-391, 1986.
- Porro M. Edited by R. Bell and G. Torrigiani (WHO), pages 279-306; New York 1987.
- Pride M.W. et al., *Clin. And Vaccine Immunol.* 19 (8):1131-1141, 2012.
- Rebers P.A. and Heidelberger M., *J. Am. Chem. Soc.*, 83: 3056-3059, 1961.
- 15 Reeves R.E. and Goebels W.F., *J. Biol. Chem.*, 139: 511-519, 1941.
- Richter S. et al., *Clin. Infect. Dis.*, 48:23-33, 2009.
- Rustici A. et al., *Science* 259: 361-365, 1993.
- Satzke C. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 48(11) : 4298, 2010.
- Schwebach, J. R., et al. 2002. *Infect Immun* 70:2566-2575.
- 20 Swanson D., IDSA meeting, Boston, 2011.
- Towbin H. et al., *PNAS* 76: 4350-4354, 1979.
- Uchida T. et al., *J. Biol. Chem.* 248, 3838-3844, 1973.
- Patente No US. 4.711.779.
- Patente No US. 5.306.492.
- 25 Xin, H. et al. (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13526-13531.
- Yao KH et al., *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 70(3) : 291-8, 2011.
- Zucker D. and Murphy J.R., *Mol. Immunol.* 21, 785-793, 1984.

## REIVINDICACIONES

1. Construcción molecular multivalente antigénica que consiste en una unidad básica que comprende una proteína transportadora dependiente de T auxiliares unida covalentemente a un mínimo de tres polisacáridos capsulares de diferente especificidad serológica por un enlazador que comprende un enlace reducido de imina y un enlace amida, en el que cada polisacárido capsular comprende al menos uno de los epítopes básicos repetitivos que consiste en un mínimo de cinco a doce restos monosacáridos caracterizados porque al menos un mol o su fracción de la proteína transportadora lleva al menos un mol o su fracción de cada uno de los al menos tres polisacáridos capsulares específicos de tipo diferentes específicos o de grupo; en donde dicha proteína transportadora dependiente de T auxiliares se selecciona entre el grupo de la proteína CRM197 de mutantes naturales de difteria, toxoide diftérico y toxoide tetánico, proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteínas neumocócicas de superficie, toxina neumocócica y toxoide tetánico químicamente derivatizado por espaciador de di-hidrazida del ácido adípico.
2. Construcción molecular multivalente antigénica según la reivindicación 1, en la que dicho epítipo básico repetitivo consiste en un mínimo de ocho a doce restos monosacáridos.
3. Construcción molecular multivalente antigénica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-2, en la que dichos polisacáridos capsulares transportados de diferente especificidad serológica se seleccionan entre los de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Candida albicans*, *Mycobacterium bovis* o una combinación de los mismos.
4. Construcción molecular multivalente antigénica según la reivindicación 3, en la que dichos polisacáridos capsulares se seleccionan entre los tipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8,9N, 9V, 10A, 11A, 11B, 11C, 11F, 12F, 14,15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23F, 33F, 35B de *Streptococcus pneumoniae* y/o entre polisacáridos del grupo A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis* y/o polisacáridos del tipo b de *Haemophilus influenzae* y/o antígenos polisacáridos K de *Klebsiella pneumoniae* y/o antígenos polisacáridos de *Staphylococcus aureus* y/o antígenos polisacáridos de *Mycobacterium tuberculosis* y/o antígenos polisacáridos de *Salmonella typhi* y/o antígenos polisacáridos de *Escherichia coli* y/o antígenos polisacáridos de *Vibrio cholerae* y/o antígenos polisacáridos de *Candida albicans* y/o *Mycobacterium bovis*, o una combinación de los mismos.
5. Construcción molecular multivalente antigénica según la reivindicación 4, en la que dicha construcción comprende la proteína transportadora CRM197 y tres polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados entre la tríada de 3,6A,7F; 4,5,9V; 1,6B,14; 18C,19A,23F; 6C,19F,22F; 12F,15B,33F; 5,9V,19F; 1,14,19A; 22F,23F,33F; 4,6B,18C.
6. Construcción molecular multivalente antigénica según la reivindicación 4, en la que dicha construcción comprende la proteína transportadora CRM197 y tres polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados entre la tríada de CRM197-3,6A,7F; CRM197-5,9V,19F; CRM197-1,14,19A; CRM197-22F,23F,33F; CRM197-4,6B,18C.
7. Construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en forma monomérica o polimérica.
8. Construcción molecular multivalente antigénica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en una vacuna para la protección de un sujeto de las infecciones debidas a al menos un patógeno seleccionado entre *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Candida albicans*.
9. Una formulación de vacuna que comprende al menos una construcción molecular multivalente antigénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en un vehículo fisiológicamente aceptable, opcionalmente junto con un adyuvante o excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. Una formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la dosis de cada tipo o antígeno de carbohidrato transportado específico de grupo oscila entre 0,1 y 10 µg, siendo preferiblemente 1,0 µg.
11. Una formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en la que dicho adyuvante se elige entre un adyuvante mineral seleccionado de fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio; un adyuvante orgánico seleccionado de adyuvantes basados en escualeno tales como MF59, QF21, Addavax y un adyuvante biológico seleccionado de monofosforil-lípido A y dicorinomicolato de trehalosa.
12. Una formulación de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la cantidad de adyuvante oscila entre 0,1-1 mg/dosis, preferiblemente es de 0,5 mg/dosis.
13. Una formulación de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-12, siendo dicha formulación adecuada para la administración por vía subcutánea, intramuscular, intracutánea o transcutánea.

14. Una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 9-13, para su uso en el campo médico humano o veterinario para la protección de un sujeto de las infecciones debidas a al menos un patógeno seleccionado entre *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *M. tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *C. albicans* y *M. bovis*, o una combinación de los mismos.
15. Una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro para su uso en el campo médico humano de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho sujeto pertenece a la población pediátrica.
16. Una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro para su uso en el campo médico humano según la reivindicación 14-15, para la prevención de enfermedades neumocócicas invasivas debido a *Streptococcus pneumoniae*, que comprende uno o más constructos moleculares multivalentes antigénicos seleccionados entre CRM197-3,6A,7F; CRM197-4,5,9V; CRM197-1,6B,14; CRM197-18C,19A,23F; CRM197-6C,19F,22F; CRM197-12F,15B,33F o entre CRM197-3,6A,7F; CRM197-5,9V,19F; CRM197-1,14,19A; CRM197-22F,23F,33F; CRM197-4,6B,18C.
17. Una formulación de vacuna de amplio espectro para su uso en el campo médico humano según las reivindicaciones 14-15, para la prevención de las infecciones debidas a *Neisseria meningitidis* que comprende una construcción molecular multivalente antigénica que contiene los polisacáridos capsulares específicos de grupo A, C, W135 e Y.
18. Una formulación de vacuna de amplio espectro para su uso en el campo médico humano o veterinario de acuerdo con las reivindicaciones 14-17, para la prevención de las infecciones sistémicas y pulmonares debidas a más de un agente infeccioso seleccionado entre *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *M. Tuberculosis*, que comprende más de una construcción molecular multivalente antigénica que contiene dichos polisacáridos capsulares específicos del agente.
19. Una formulación de vacuna de amplio espectro para su uso en el campo médico humano o veterinario según las reivindicaciones 14-17, para la prevención de las infecciones intestinales debidas a más de un agente infeccioso seleccionado entre *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, que comprende más que una construcción molecular multivalente antigénica que contiene dichos polisacáridos capsulares específicos del agente.
20. Una formulación de vacuna de amplio espectro para su uso en el campo médico humano según las reivindicaciones 14-17, para la prevención de infecciones sistémicas y genitourinarias debidas a *Candida albicans* y *Escherichia coli* que comprende más de una construcción molecular multivalente antigénica que contiene dichos polisacáridos capsulares específicos de agente.
21. Formulación de vacuna para su uso en el campo médico humano o veterinario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-20 para la administración separada, simultánea o secuencial con un endotoxide de bacterias gram negativas, seleccionándose dicho endotoxide en el grupo constituido por endotoxide de *N. meningitidis* grupo B, *E.coli*, *S. typhi*, *V. cholerae*, *S. enteritidis* y *B. pertussis*.
22. Un proceso de conjugación para preparar el constructo molecular multivalente antigénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende los siguientes pasos:
- a) activación química de los al menos tres polisacáridos capsulares antigénicamente diferentes a monofuncionalidad o polifuncionalidad mediante desacoplamiento de O-des-hidrógeno a través de la oxidación y aminación reductiva formando enlaces reducidos de imina con un espaciador de alquil diamina, luego derivatizados a ésteres activos; y
- b) acoplamiento simultáneo, o un acoplamiento paso a paso, de los al menos tres polisacáridos capsulares derivados de éster a los grupos amino de la proteína transportadora polifuncional a través de la formación de enlaces amida; en el que dicha proteína transportadora se selecciona entre el grupo de la proteína natural mutante de difteria CRM197, toxoide diftérico y toxoide tetánico, proteína D de *Haemophilus influenzae*, proteínas neumocócicas de superficie, toxina neumocócica y toxoide tetánico químicamente derivatizado por espaciador de dihidrazida de ácido adípico;
- en el que al menos un mol o fracción del mismo de la proteína transportadora se hace reaccionar con al menos un mol o fracción del mismo de cada uno de los al menos tres polisacáridos capsulares específicos del tipo diferentes o específicos del grupo.
23. Un proceso de conjugación de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dichos polisacáridos capsulares se activan químicamente en sus correspondientes derivados de ácido butírico diamínico y los ésteres activos son ésteres de succinimidilo.
24. Un proceso de conjugación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-23 en el que dicha proteína transportadora polifuncional es CRM197.



25. Un proceso de conjugación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en el que dichos al menos tres polisacáridos capsulares se seleccionan entre las siguientes tríadas de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* 3,6A,7F; 4,5,9V; 1,6B,14; 18C,19A,23F; 6C,19F,22F; 12F,15B,33F; 5,9V,19F; 1,14,19A; 22F,23F,33F; 4,6B,18C.
- 5 26. El proceso de conjugación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en el que los polisacáridos capsulares de la etapa a) comprenden al menos uno de los epítopes básicos repetidos según se evalúa mediante Inhibición-ELISA, que consiste en un mínimo de cinco a doce residuos monosacáridos según la evaluación por determinación de masa molecular y espectroscopía de RMN.
- 10 27. Construcción molecular multivalente antigénica que se puede obtener a través del proceso de conjugación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 - 26.

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de Ps 3 y derivado Ps3-DAB

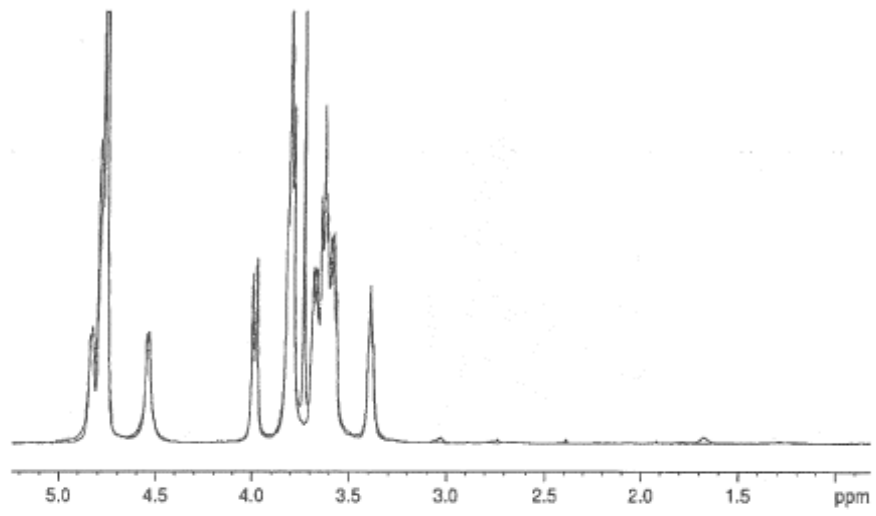


FIG.1

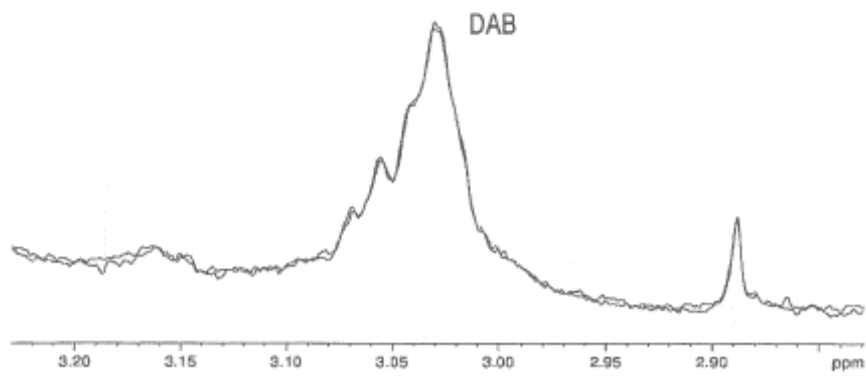


FIG.2

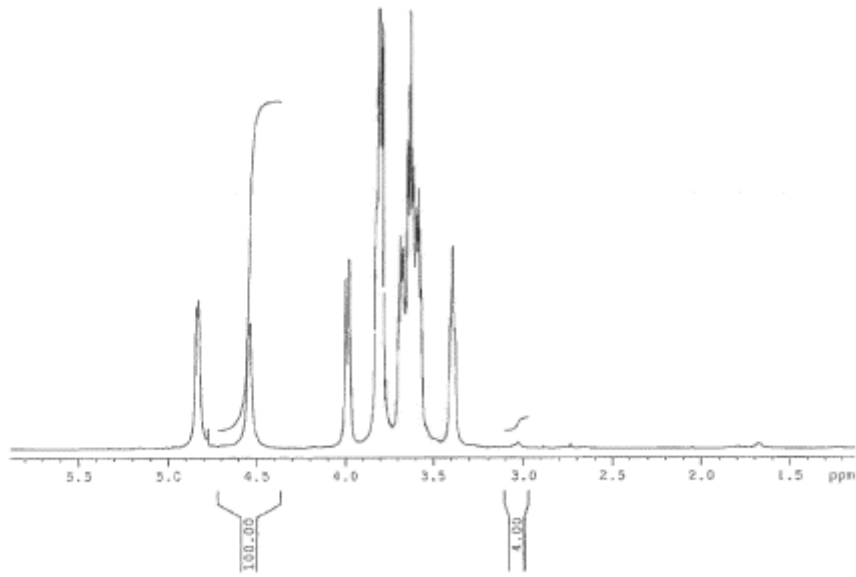


FIG.3

Espectro <sup>1</sup>H-RMN de Ps6A y derivado Ps6A-DAB

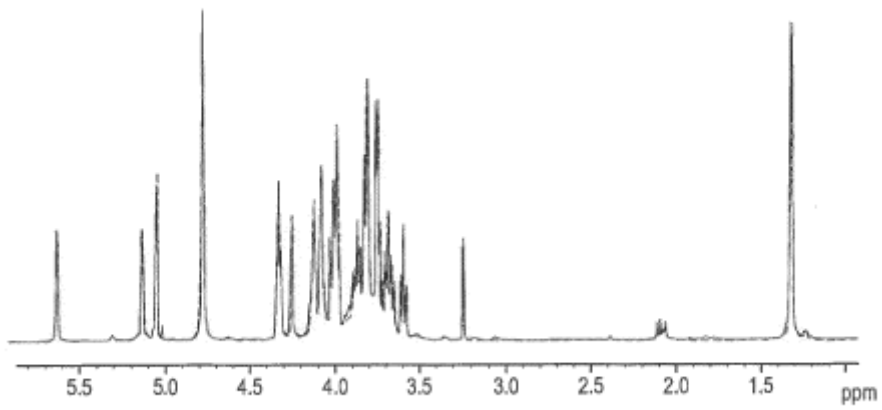


FIG.4

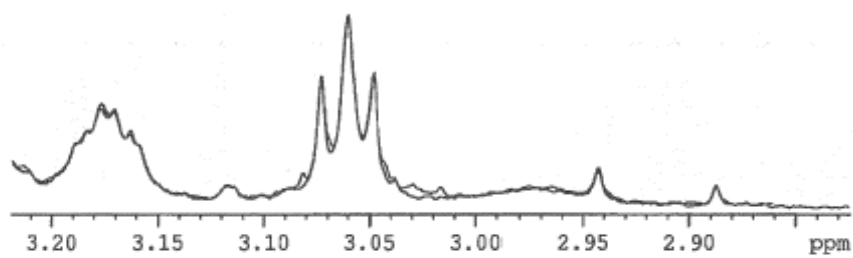


FIG.5

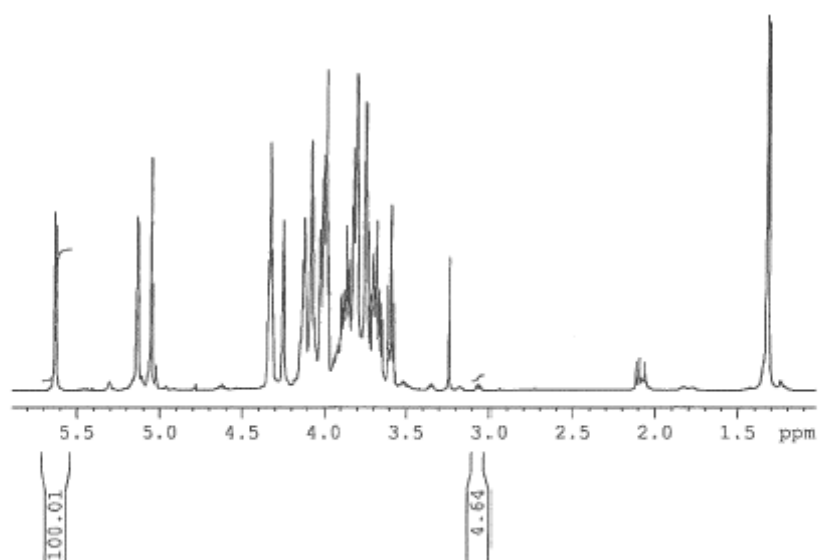


FIG.6

Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de Ps7F y derivado Ps7F-DAB

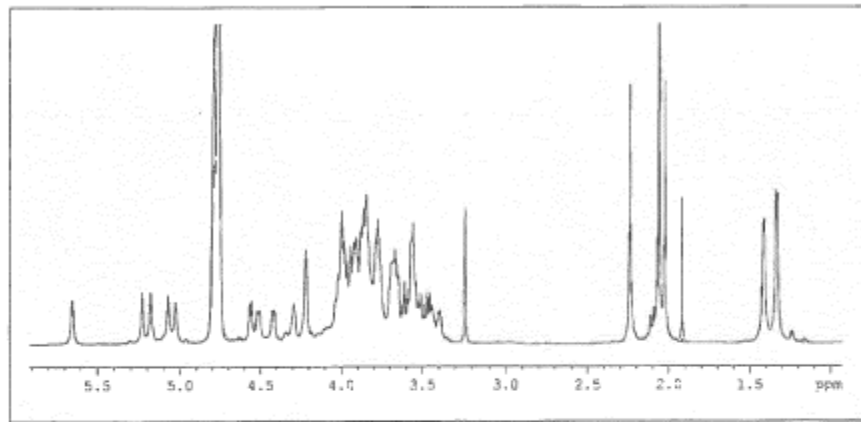


FIG.7

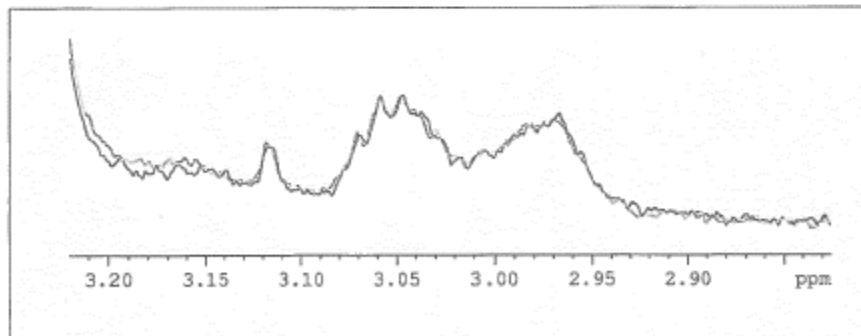


FIG.8

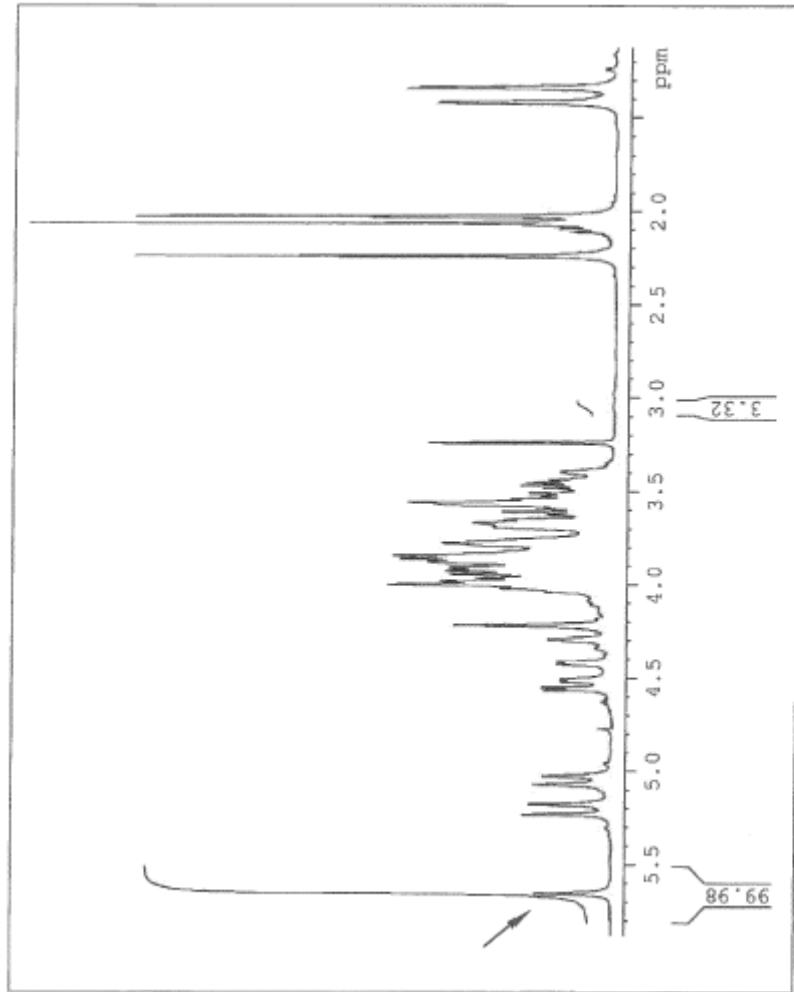


FIG.9

FIG.10

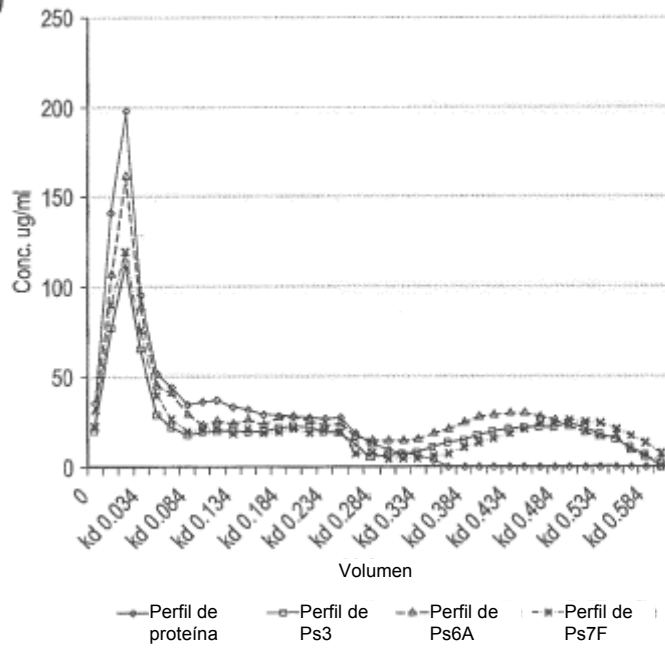
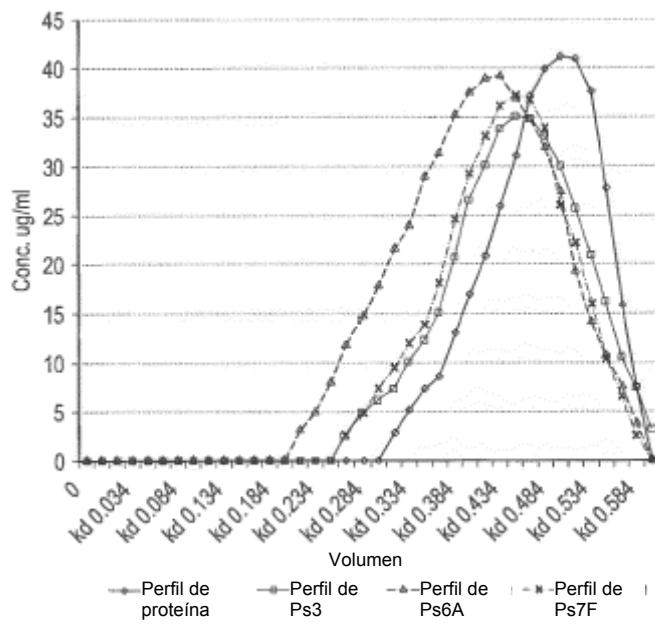
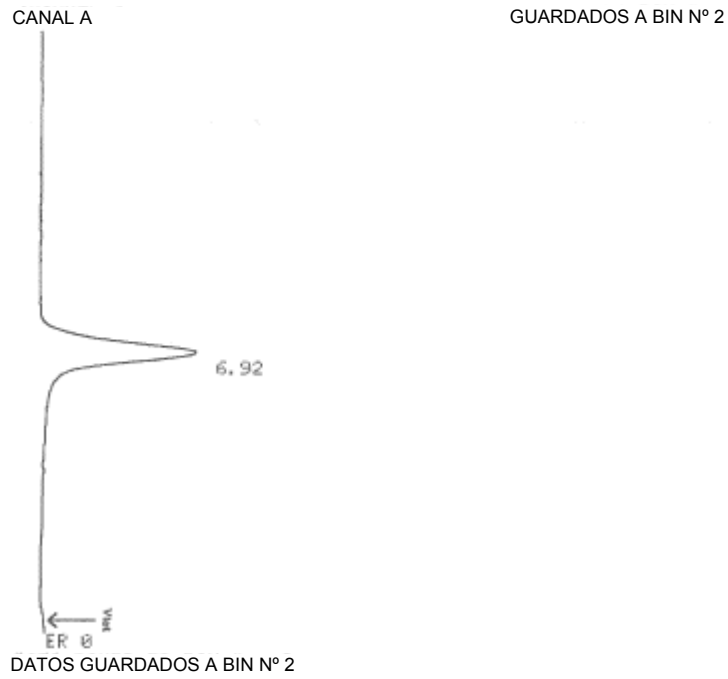


FIG.11

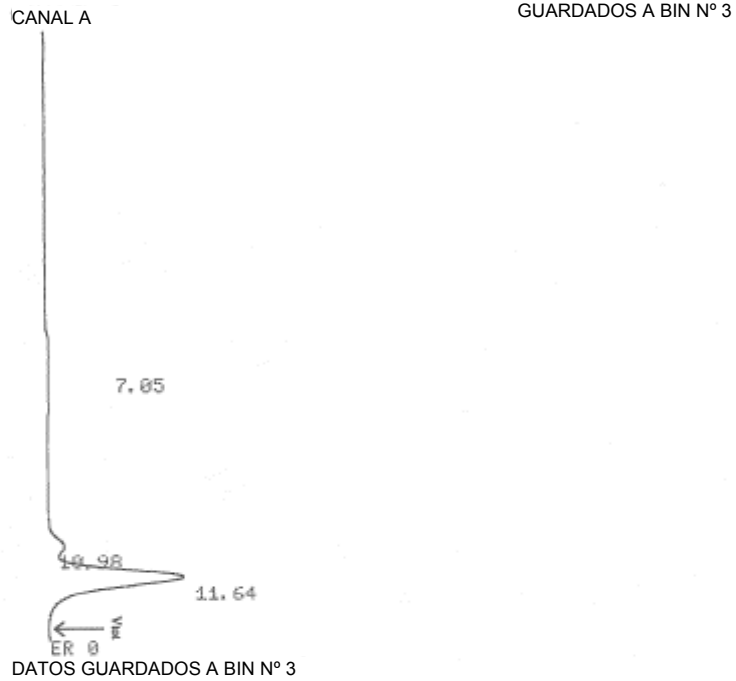




ARCHIVO 1.	MÉTODO 0.	PROCESO 2	ÍNDICE 2	BIN 2
PICO Nº	ÁREA %	TA	ÁREA BC	
1	100.	6.92	732249 01	
TOTAL	100.		732249	

FIG.12





ARCHIVO 1.	MÉTODO 0.	PROCESO 3	ÍNDICE 3	BIN 3
PICO N°	ÁREA %	TA	ÁREA BC	
1	7.2	7.05	43170	01
2	8.12	10.98	48686	02
3	84.68	11.64	507727	03
TOTAL	100.		599583	

FIG.13

FIG.14

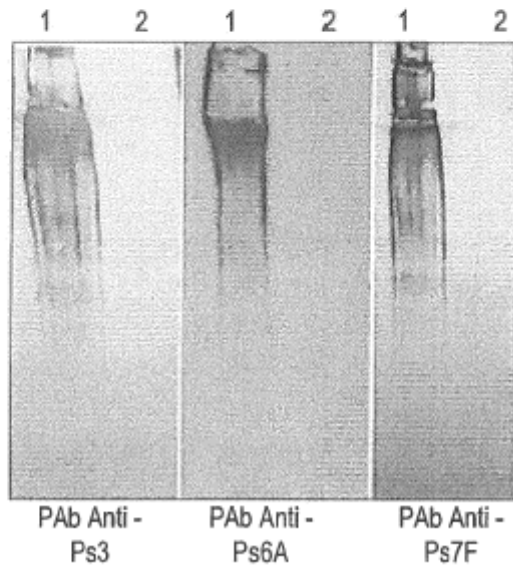
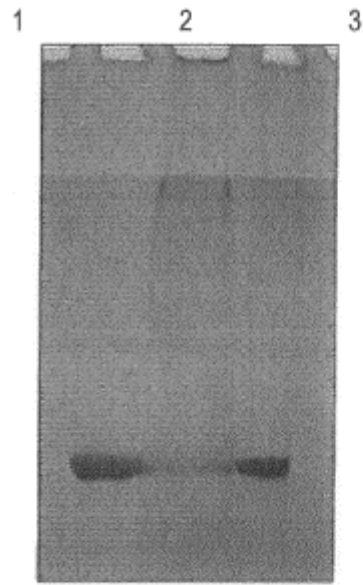


FIG.15

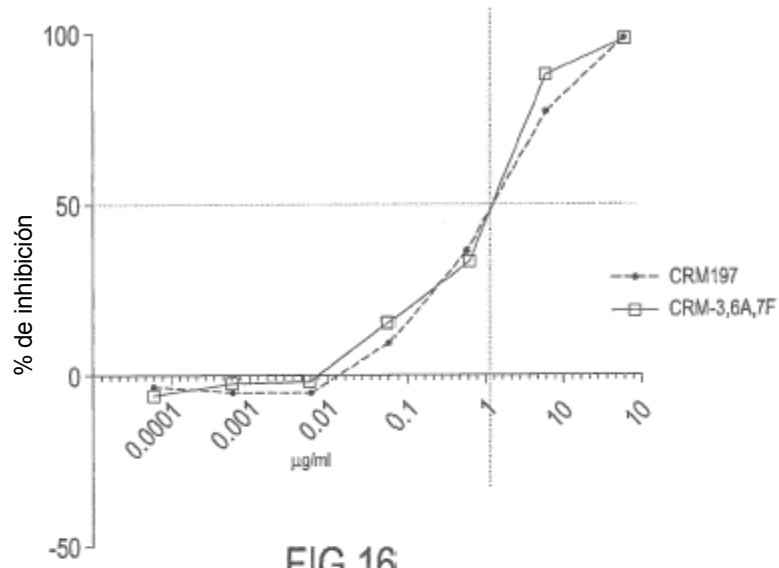
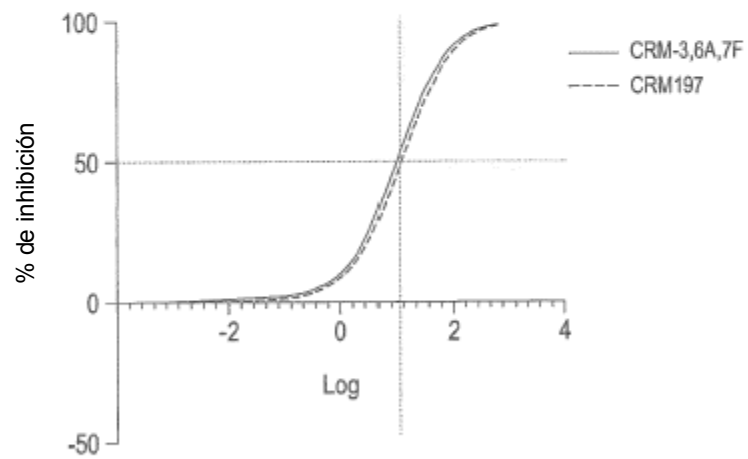
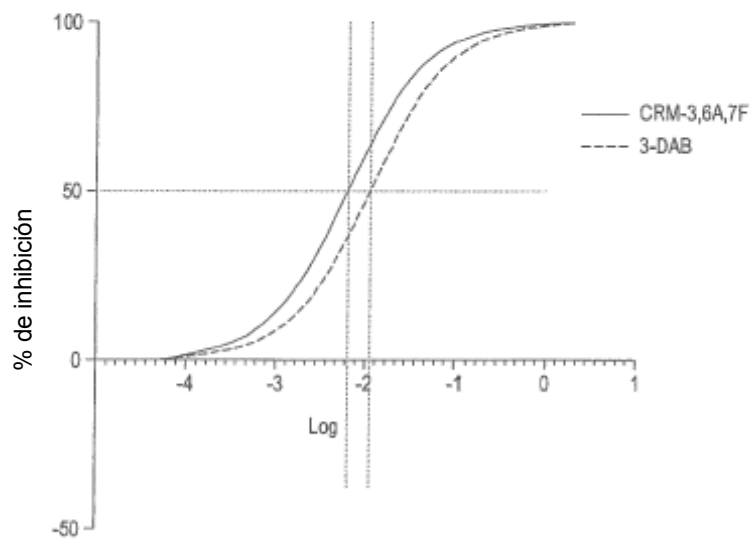
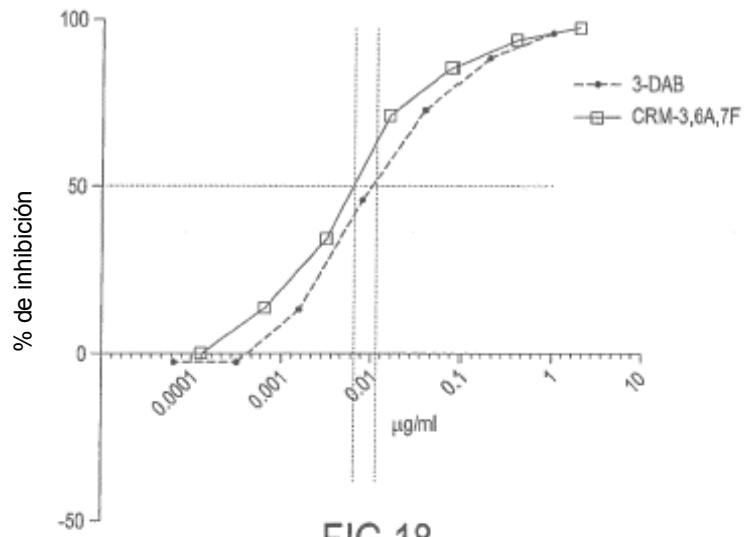


FIG.16



	CRM197	CRM-3,6A,7F
LogEC50	1.084	1.008
EC50	12.14	10.19

FIG.17



	3-DAB	CRM-3,6A,7F
LogEC50	-1.937	-2.187
EC50	0.01156	0.006506

FIG. 19

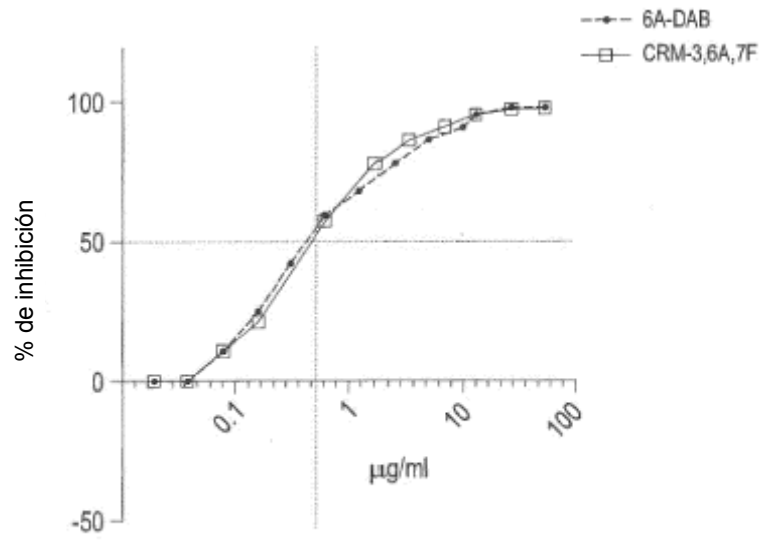
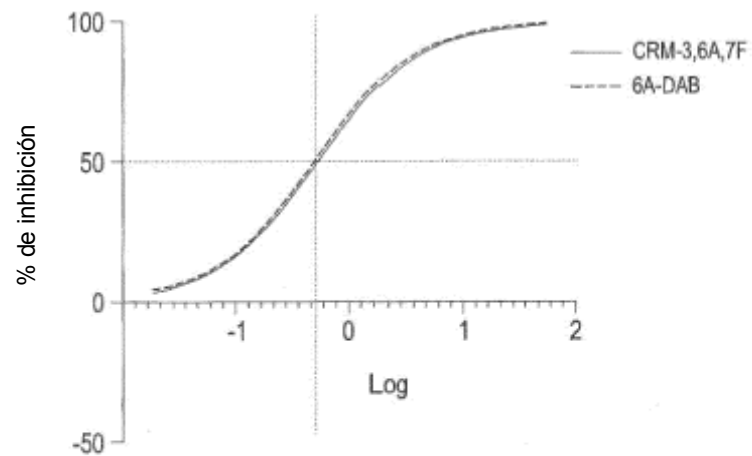


FIG.20



	6A-DAB	CRM-3,6A,7F
LogEC50	-0.2957	-0.2820
EC50	0.5061	0.5224

FIG.21

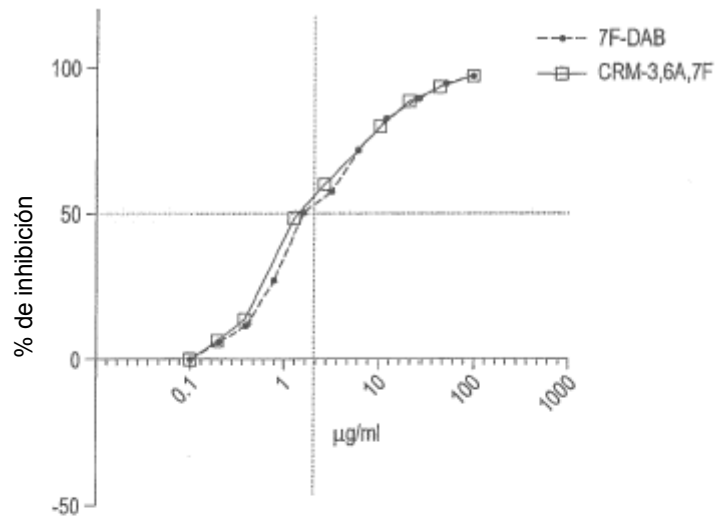
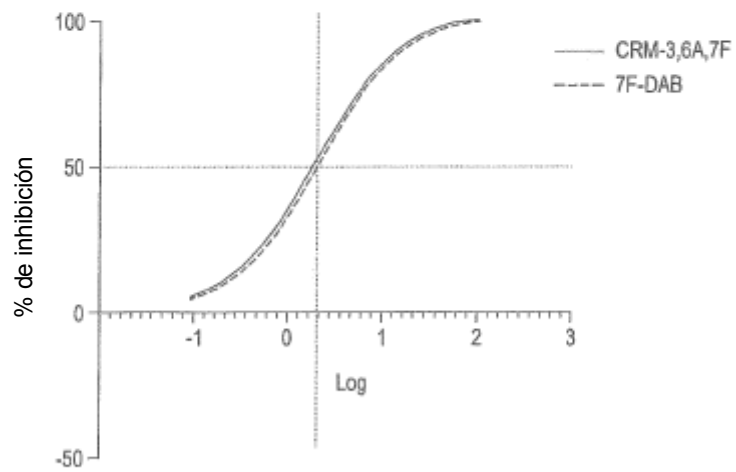


FIG.22



	7F-DAB	CRM-3,6A,7F
LogEC50	0.3390	0.3023
EC50	2.183	2.006

FIG.23