

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 796**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2005** E 11163751 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** EP 2374473

54 Título: **Análisis dimensional de conjugados de sacáridos con GPC y SEC-MALS**

30 Prioridad:

**21.06.2004 GB 0413868**

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

**07.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CAPANNOLI, GIORGIO;  
CARINCI, VALERIA;  
D'ASCENZI, SANDRO y  
MAGAGNOLI, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 688 796 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

Análisis dimensional de conjugados de sacáridos con GPC y SEC-MALS

**Campo de la invención**

5 La presente invención pertenece al campo de las vacunas que incluyen sacáridos capsulares bacterianos conjugados a un transportador.

**Antecedentes de la invención**

10 Los inmunógenos que comprenden antígenos sacáridos capsulares conjugados a proteínas transportadoras son conocidos en la técnica. La conjugación transforma antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes, por lo que mejora la respuesta de memoria y permite que se desarrolle la protección inmunológica. El prototipo de vacuna conjugada fue para *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) [véase el ejemplo del capítulo 14 de la ref. 1]. Desde la vacuna contra Hib, se han desarrollado vacunas de sacáridos conjugados contra *Neisseria meningitidis* (meningococo) y contra *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), como las vacunas conjugadas meningocócicas polivalentes que aparecen en la referencia 50. Otros organismos en los que las vacunas conjugadas son de interés son *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [2], *Pseudomonas aeruginosa* [3] y *Staphylococcus aureus* [4].

15 En vez de utilizar sacáridos capsulares de cadena larga, es posible seleccionar fragmentos de oligosacáridos del tamaño deseado después de una fase de hidrólisis [p.ej., ref. 5], y se ha informado que los conjugados de oligosacáridos de cadena media ofrecen una inmunogenicidad mejorada [p.ej., ref. 6 y 7]. De las tres vacunas conjugadas contra la *N. meningitidis* del serogrupo C cuyo uso se ha aprobado en humanos, Menjugate™ [8] y Meningitec™ se basan en oligosacáridos, mientras que NeisVac-C™ usa un polisacárido de cadena larga.

20 Cuando se incluyen conjugados en una vacuna, el control de calidad para producirlos y comercializarlos generalmente necesita que estos tengan un tamaño molecular y/o una masa molar definidos, y también que esos parámetros sean consistentes entre los lotes. El tamaño molecular y la masa molar también se pueden utilizar para controlar la estabilidad de la vacuna, ya que se pueden añadir conjugados según avanza el tiempo, lo que provoca un aumento en el tamaño y en la masa.

25 Un objeto de la invención es proporcionar conjugados de sacáridos meningocócicos.

**Descripción de la invención**

30 Los inventores han descubierto que la cromatografía de permeabilidad en geles y SEC-MALS (cromatografía por exclusión de tamaño con detector de dispersión de luz multiangular) pueden utilizarse para medir de manera precisa y fiable el tamaño molecular y la masa molar, respectivamente, de sacáridos conjugados. El tiempo de retención del análisis cromatográfico se puede transformar en un radio de viscosidad ( $R\eta$ ); por ejemplo, por comparación con la curva de calibración, lo que permite un cálculo fácil del tamaño molecular. El tamaño molecular medio y/o la distribución de los tamaños moleculares de conjugados de una muestra se pueden determinar fácilmente de esta manera. De forma similar, el tiempo de retención de SEC se puede transformar en masa molar. La masa molar media y/o la distribución de la masa molar (polidispersidad) de conjugados de una muestra se pueden determinar fácilmente de esta manera. La referencia 9 señala que SEC-MALS se ha utilizado con anterioridad para medir la preconjugación de sacáridos neumocócicos y meningocócicos, sin embargo, no existen datos sobre postconjugación.

40 Estos métodos se pueden usar para medir el tamaño molecular y/o la masa molar de conjugados de CRM197 con los sacáridos capsulares meningocócicos de los serogrupos A, C, W135 e Y, y, tal como se expone en la reivindicación 1, la invención proporciona el uso de dichos conjugados en la producción de una vacuna.

El sacárido

La invención permite medir los parámetros de antígenos sacáridos conjugados. El antígeno sacárido es un sacárido capsular bacteriano de la *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, C, W135 o Y).

45 La cápsula de la *N. meningitidis* del serogrupo A es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con enlaces ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. El sacárido capsular de la *N. meningitidis* del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico o Neu5Ac) con enlaces ( $\alpha 2 \rightarrow 9$ ), con una O-acetilación variable en las posiciones 7 y/u 8. El sacárido de la *N. meningitidis* del serogrupo W135 es un polímero que consiste en unidades de disacárido de ácido siálico-galactosa [ $\rightarrow 4$ ]-D-Neup5Ac(7/9OAc)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-D-gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ ), con O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [10]. El sacárido de la *N. meningitidis* del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto en que la unidad repetitiva del disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa [ $\rightarrow 4$ ]-D-Neup5Ac(7/9OAc)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Glc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ ). El sacárido capsular de la *H. influenzae* del tipo B es un polímero de ribosa, ribitol y fosfato ["PRP", (poli-3- $\beta$ -D-ribosa-(1, 1)-D-ribitol-5-fosfato)].

50 La invención es particularmente útil para analizar fragmentos de oligosacáridos de polisacáridos capsulares. Por lo general, los polisacáridos naturales tienen un grado de polimerización de al menos 20 (p. ej., 20, 30, 40, 50, 60 o

más), y estos pueden transformarse en fragmentos de oligosacáridos (p. ej., con un grado de polimerización de menos de 20) mediante despolimerización, como, por ejemplo, por hidrólisis.

La hidrólisis química de sacáridos, por lo general, implica tratamiento tanto con un ácido como con una base en condiciones que son estándar en la técnica. Las condiciones para la despolimerización de sacáridos capsulares a sus monosacáridos constituyentes son conocidas en la técnica. Se prefiere la hidrólisis ácida para los sacáridos de los serogrupos W135 e Y. La hidrólisis ácida con TFA (ácido trifluoroacético) se puede utilizar para hidrolizar todos los serogrupos C, W135 e Y, preferentemente a una temperatura de incubación ligeramente inferior para el serogrupo C, para evitar la degradación de sus ácidos siálicos (90°C en vez de 100°C). El tratamiento típico con TFA implica añadir TFA en una concentración final de 2 M, seguido por aplicación de calor a 90-100°C durante 90 minutos. El sacárido del serogrupo C puede hidrolizarse para el análisis del contenido total de sacáridos mediante tratamiento con 100 mM de HCl a 80°C durante 2 horas [11]. Otras condiciones de hidrólisis típicas implican concentraciones milimolares de un ácido débil (p.ej. ácido acético) a altas temperaturas (p. ej., 70-80°C).

La invención es particularmente útil para su uso en muestras conjugadas que incluyen varios sacáridos de distintas longitudes, por ejemplo, fragmentos diferentes del mismo sacárido original.

## 15 Conjugados

El antígeno sacárido que se va a analizar se conjuga con una proteína transportadora CRM197. Se utiliza conjugación covalente para mejorar la inmunogenicidad de los sacáridos al transformarlos de antígenos T-independientes a antígenos T-dependientes, lo que permite la imprimación de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil en las vacunas pediátricas y es conocida en la técnica [p. ej., en las referencias de la 12 a la 21]. Los sacáridos pueden unirse directamente a transportadores [22, 23], pero una molécula de unión o una separadora se usa por lo general, como en el ácido adípico,  $\beta$ -propionamida [24], nitrofeniletamina [25], haluros de haloacilo [26], enlaces glicosídicos [27], ácido 6-aminocaproico [28], ADH [29], restos C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [30], etc.

El derivado de la toxina diftérica CRM197 [31-33] es una proteína transportadora en Menjugate™ y Meningitec™, mientras que el toxoide tetánico se usa en NeisVac™. En Menactra™, se utiliza toxoide diftérico como el transportador. La proteína transportadora en Prevnar™ es CRM197.

Los conjugados tienen generalmente una relación sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido). Las composiciones pueden incluir una proteína transportadora libre además de los conjugados [49].

Se pueden preparar conjugados de sacáridos meningocócicos (serogrupos A, C, W135 e Y) con la transportadora CRM197 según los métodos descritos en las referencias 50-53. Los conjugados que se prefieren son aquellos que se preparan según la referencia 51, es decir, fragmentos de oligosacáridos con una transportadora CRM197 y un enlazador de ácido adípico.

## Cromatografía de permeabilidad en geles

La cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) es conocida en la técnica estándar. Por lo general, la medición utiliza HPGPC (GPC de alto rendimiento). Las técnicas de GPC se utilizan para determinar el tamaño hidrodinámico (en una mezcla, el tamaño medio y/o la distribución de los tamaños) de un conjugado en una muestra.

El tiempo de retención en una columna de GPC se puede transformar en un radio de viscosidad (R $\eta$ ) por medio de técnicas estándar. Normalmente, el tiempo de retención en una columna se determinará por los estándares de un tamaño molecular conocido, lo que permite que exista una correlación de estos dos parámetros. Por lo tanto, el tamaño molecular de un conjugado se puede inferir a partir de su tiempo de retención en la columna. Por ejemplo, la calibración de una columna por medio de dextranos de un tamaño molecular conocido y sus tiempos de retención pueden estar correlacionados con el radio de viscosidad al usar una ecuación polinómica de tercer grado [54, 55]. El radio de viscosidad utiliza la viscosidad intrínseca y la masa molecular para explicar el efecto que tiene la forma de la molécula en la retención.

En una mezcla heterogénea, la técnica de GPC se puede utilizar para determinar el tamaño molecular medio y/o la distribución del tamaño molecular en la mezcla.

## SEC-MALS

La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) es una técnica conocida. Los resultados de la separación se pueden analizar mediante fotometría de dispersión de luz multiangular (MALS) y refractometría diferencial. Este método puede proporcionar información sobre la distribución de la masa molar y del radio hidrodinámico (tamaño molecular), confirmación y otros parámetros físicos de un polímero, independientemente de parámetros cromatográficos tales como caudal y fase estacionaria sin la necesidad de calibración para la masa molar [9]. En vez de necesitar calibración para la masa molar, la determinación de la masa molar mediante MALS se basa en una determinación previa del índice de refracción específico (dn/dc), para el polímero de interés en el disolvente de interés a una longitud de onda y temperatura de interés.

De este modo, SEC-MALS se puede utilizar para determinar la masa molar de un conjugado. La masa molar de una muestra se determina en cada segmento de datos de un pico de la SEC, como se ha observado en un gráfico de Debye típico, donde la masa molar se determina a partir de la intersección del gráfico [56-58]. La señal del índice de refracción proporcional a la concentración y la señal MALS 90° proporcional a la concentración y a la masa molar pueden superponerse para determinar las distribuciones de la masa molar.

En una mezcla heterogénea, la técnica SEC-MALS puede utilizarse para determinar la masa molar y/o la distribución de la masa molar (polidispersidad) en la mezcla.

#### Conjugados

Los conjugados definidos en la reivindicación 1 tienen una transportadora CRM197 y lo siguiente:

- 10 a) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A, en el que el tamaño molecular del conjugado es 57,1 Å y/o la masa molar del conjugado es 88,5 kDa,
- b) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C, en el que el tamaño molecular del conjugado es 57,0 Å y/o la masa molar del conjugado es 85,2 kDa,
- 15 c) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135, en el que el tamaño molecular del conjugado es 68,7 Å y/o la masa molar del conjugado es 110,1 kDa, y
- d) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y, en el que el tamaño molecular del conjugado es 63,3 Å y/o la masa molar del conjugado es 84,7 kDa.

Aunque los valores anteriores para el tamaño molecular y la masa molar se dan como cifras únicas, la invención se extiende a conjugados en los que estas cifras varían  $\pm 2\%$ .

#### 20 Sacáridos mixtos

Las técnicas descritas en este documento permiten el análisis de composiciones que comprenden conjugados de sacáridos capsulares. En general, las muestras contienen un único tipo de conjugado (es decir, sacáridos derivados del mismo sacárido capsular, unido al mismo transportador). Por lo tanto, en vacunas conjugadas polivalentes, por lo general, las mediciones se llevan a cabo en conjugados individuales antes de que se combinen para crear el producto polivalente final, en vez de hacerlo directamente en el producto final. Sin embargo, si dos conjugados tienen tamaños moleculares y masas molares muy diferentes, directamente, se realiza un análisis paralelo.

#### Estabilidad durante el almacenamiento

La invención puede utilizarse para controlar la estabilidad de los conjugados durante el almacenamiento. Por lo que estos métodos pueden llevarse a cabo en muestras del mismo material en el tiempo t1 y t2, y los resultados del análisis se pueden comparar. Un cambio significativo en la masa molar y/o en el tamaño molecular indica que la vacuna no es completamente estable. Por lo que los resultados pueden utilizarse para seleccionar vacunas estables y rechazar las inestables.

#### General

El término "comprender" abarca tanto "incluir" como "consistir en"; por ejemplo, una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir otro componente adicional, como X + Y.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una curva de calibración de seis dextranos de tamaños hidrodinámicos conocidos.

Las figuras de la 2 a la 5 muestran análisis HPGPC de conjugados de CRM197 de los serogrupos A, C, W135 e Y.

La figura 6 muestra la tensión de salida ajustada de concentraciones conocidas; en las figuras 7 y 8, se muestra para calibración dn/dc.

La figura 9 muestra un gráfico de Debye de SEC-MALS, y la figura 10 muestra la superposición de la señal IR y la señal de MALS 90°.

Las figuras de la 11 a la 14 muestran el análisis de la masa molar mediante SEC-MALS para conjugados de CRM197 de los serogrupos A, C, W135 e Y.

#### 45 Modos de realización de la invención

Conjugados de CRM197 de oligosacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y de meningococo se prepararon como se describe, en general, en la referencia 51. Cada uno de estos conjugados se analizó mediante HPGPC y SEC-MALS según la invención.

Análisis HPGPC

5 En general, las vacunas glicoconjugadas consisten en un conjunto de glicofomas con una gama de sacáridos de distintas longitudes, unido a una proteína transportadora en múltiples emplazamientos. HPGPC se utilizó para describir los glicoconjugados meningocócicos desde el punto de vista del tamaño molecular, al determinar su tamaño hidrodinámico y su distribución.

La calibración se realizó por medio de un conjunto de seis dextranos con tamaños hidrodinámicos que se encontraban entre 17 y 115 Å. El análisis HPGPC de los estándares se muestra en la figura 1. Los pesos moleculares estándar y los pesos moleculares calculados fueron los siguientes:

<b>Estándar</b>	115360	54130	26000	91840	38560	17590
<b>Calculado</b>	115666	53847	25425	91514	39280	17767

10 El análisis de dextrano se utilizó para correlacionar el radio de viscosidad (R $\eta$ ) con el tiempo de retención de GPC mediante el uso de una ecuación polinómica de tercer grado [54, 55]:

$$R\eta \text{ (en \AA)} = (10^8) (30 M_p [\eta] / (\pi \times 6,023 \times 10^{23}))^{1/3}$$

en la que: M<sub>p</sub> = PM apical y  $[\eta]$  = viscosidad intrínseca en dL/g

15 Los radios de viscosidad de los conjugados se calcularon a partir de esta ecuación, la cual utiliza viscosidad intrínseca y PM para calcular el efecto que la forma de la molécula tiene sobre la retención.

El análisis de conjugados individuales se muestra en las figuras de la 2 a la 5. Los tamaños hidrodinámicos se calcularon de la siguiente manera:

<b>Serogrupo</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>W135</b>	<b>Y</b>
<b>Tamaño (Å)</b>	57,1	57,0	68,7	63,3
<b>Polidispersidad</b>	1,032	1,018	1,040	1,035

20 Como ejemplo de las condiciones del análisis, el conjugado del serogrupo A se analizó en un volumen de inyección de 50  $\mu$ l en TSK-Gel G4000SW (300 x 7,5 mm Di), con una fase móvil de 0,1 M de fosfato de sodio / 0,2 M de sulfato de amonio, pH 7,0. El caudal fue 0,5 ml/min. Se utilizó un detector de índice de refracción 410 de Waters.

Análisis SEC-MALS

25 Antes del análisis SEC-MALS, se determinaron los índices de refracción (dn/dc) de los conjugados en las condiciones del análisis. Un ejemplo de tensión de salida para la concentración establecida se muestra en la figura 6. Esta tensión de salida provoca las curvas estándar mostradas en las figuras 7 y 8. Los valores calculados fueron los siguientes:

<b>Serogrupo</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>W135</b>	<b>Y</b>
<b>dn/dc</b>	0,163	0,190	0,159	0,201

30 Los conjugados se analizaron por medio de SEC-MALS. La masa molar de las muestras se determinó en cada segmento de datos de un pico de una SEC, como se muestra en un gráfico de Debye típico en la figura 9. La masa molar se determinó a partir de la intersección del gráfico [56-58]. La señal IR (azul), proporcional a la concentración, y el detector MALS 90° (rojo), proporcional a la concentración y a la masa molar, se pueden superponer (figura 10).

35 Los análisis de la masa molar (gramos por mol) se muestran en las figuras de la 11 a la 14. Los análisis muestran que los glicoconjugados de MenA, MenW135 y MenY tienen un pico principal con un hombro a una baja concentración de un PM mayor, mientras que el conjugado de MenC tiene un pico único de composición más homogénea.

Los resultados de los análisis de los picos (PM en kDa; polidispersidad en PM/Mn) son los siguientes:

		<b>A</b>	<b>C</b>	<b>W135</b>	<b>Y</b>
<b>Pico principal</b>	<b>PM</b>	88,540	85,230	110,100	84,650
	<b>Polidispersidad</b>	1,012	1,011	1,049	1,050
<b>Hombro</b>	<b>PM</b>	190,000	-	485,800	347,200
	<b>Polidispersidad</b>	1,053	-	1,090	1,096

Se entenderá que la invención se ha descrito solo a modo de ejemplo y que cualquier modificación puede llevarse a cabo mientras permanezca dentro del alcance de la invención.

**Referencias**

5 [1] Vaccines (eds. Plotkin et al.) 4<sup>ta</sup> edición, ISBN: 0721696880.  
 [2] Baker et al. (2003) J Infect Dis 188:66-73.  
 [3] Theilacker et al. (2003) Infect Immun 71:3875-84.  
 [4] Anónimo (2003) Drugs R D 4:383-5.  
 [5] Ravenscroft et al. (1999) Vaccine 17:2802-2816.

10 [6] Paoletti et al. (1992) J Clin Invest 89:203-9.  
 [7] Anderson et al. (1986) J Immunol 137:1181-6.  
 [8] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.  
 [9] D'Ambra et al. (2000) Dev Biol Basel 103:241-242.  
 [10] WO2005/033148.

15 [11] Jumel et al. (2002) Biotechnol Appl Biochem 36:219-226.  
 [12] Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-196.  
 [13] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.  
 [14] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.  
 [15] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.

20 [16] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.  
 [17] Patente europea 0477508.  
 [18] Patente de Estados Unidos 5,306,492.  
 [19] WO98/42721.  
 [20] Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, especialmente vol. 10:48-114.

25 [21] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 o 012342335X.  
 [22] Patente de Estados Unidos 4,761,283  
 [23] Patente de Estados Unidos 4,356,170  
 [24] WO00/10599  
 [25] Gevert et al. Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).

30 [26] Patente de Estados Unidos 4,057,685.

- [27] Patente de Estados Unidos 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [28] Patente de Estados Unidos 4,459,286.
- [29] Patente de Estados Unidos 4,965,338
- [30] Patente de Estados Unidos 4,663,160.
- 5 [31] Anónimo (Ene 2002) Research Disclosure, 453077.
- [32] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [33] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [49] WO96/40242
- [50] WO02/058737.
- 10 [51] WO03/007985.
- [52] Rennels et al. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
- [53] Campbell et al. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
- [54] Kunitani et al. (1991) J Chrom 588:125ff.
- [55] Kunitani et al. (1993) J Chrom 632:19ff.
- 15 [56] Wyatt (1997) Instrumentation Science & Technology 25(1):1ff.
- [57] Wen et al. (1996) Anal Biochem 240:155ff.
- [58] Rollings (1992) in Laser Light Scattering in Biochemistry, capítulo 19.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de conjugados para la producción de una vacuna que comprende conjugados de *N. meningitidis* de los serogrupos A, C, W135 e Y, en donde los conjugados son a) un conjugado de CRM197 y un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A, en donde el tamaño molecular del conjugado es  $57,1 \pm 2\%$  Å y/o la masa molar del conjugado es  $88,5 \pm 2\%$  kDa; b) un conjugado de CRM197 y un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C, donde el tamaño molecular del conjugado es  $57,0 \pm 2\%$  Å y/o la masa molar del conjugado es  $85,2 \pm 2\%$  kDa; c) un conjugado de CRM197 y un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135, donde el tamaño molecular del conjugado es  $68,7 \pm 2\%$  Å y/o la masa molar del conjugado es  $110,1 \pm 2\%$  kDa; y d) un conjugado de CRM197 y un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y, donde el tamaño molecular del conjugado es  $63,3 \pm 2\%$  Å y/o la masa molar del conjugado es  $84,7 \pm 2\%$  kDa.

FIGURA 1

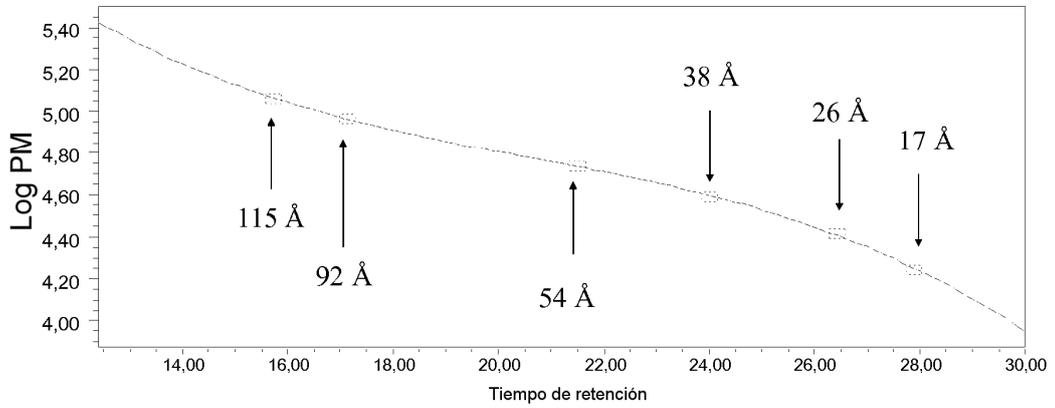
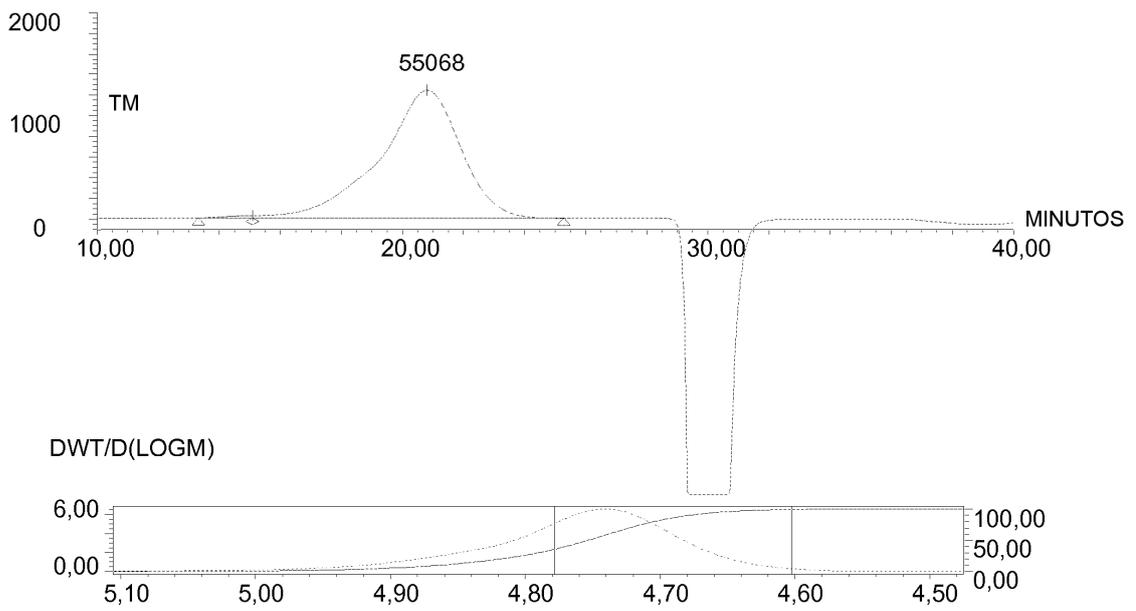
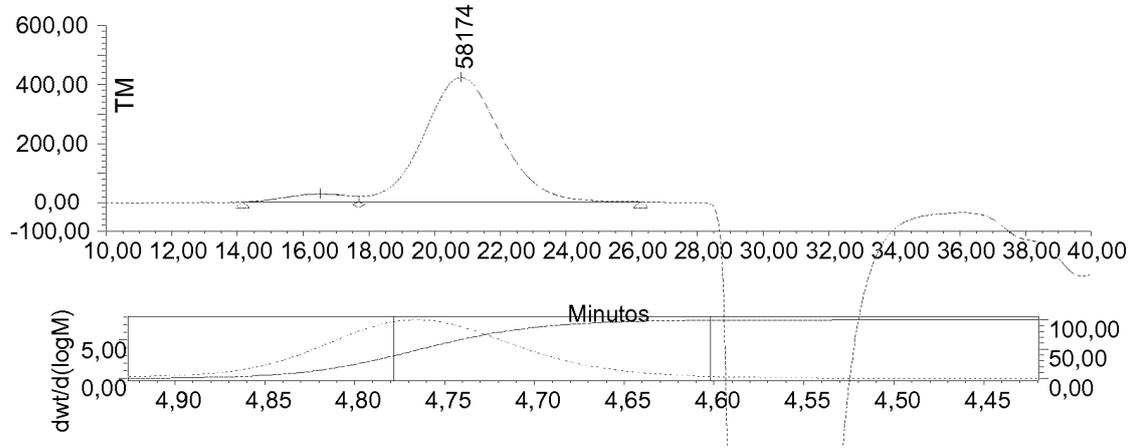


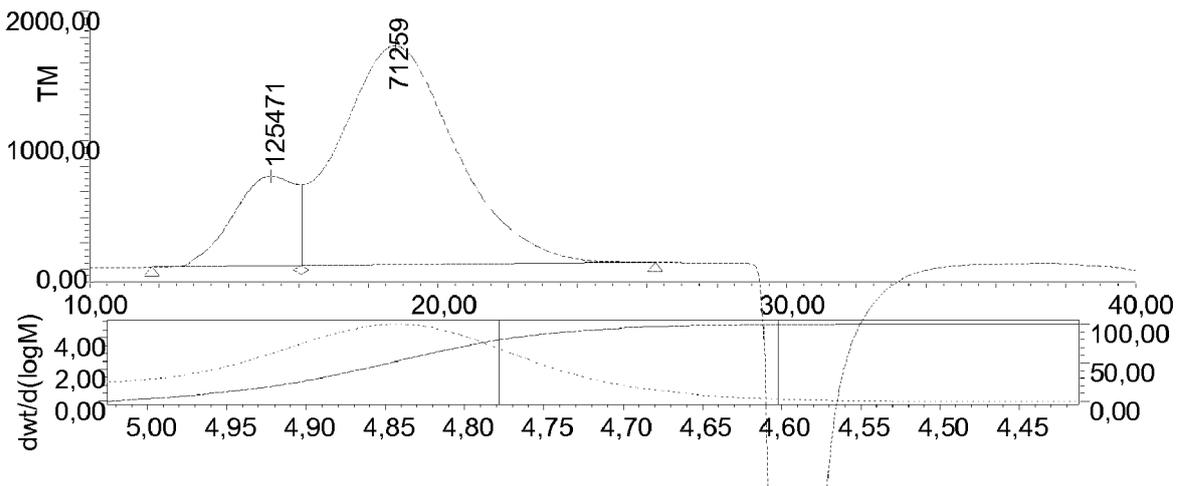
FIGURA 2



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**

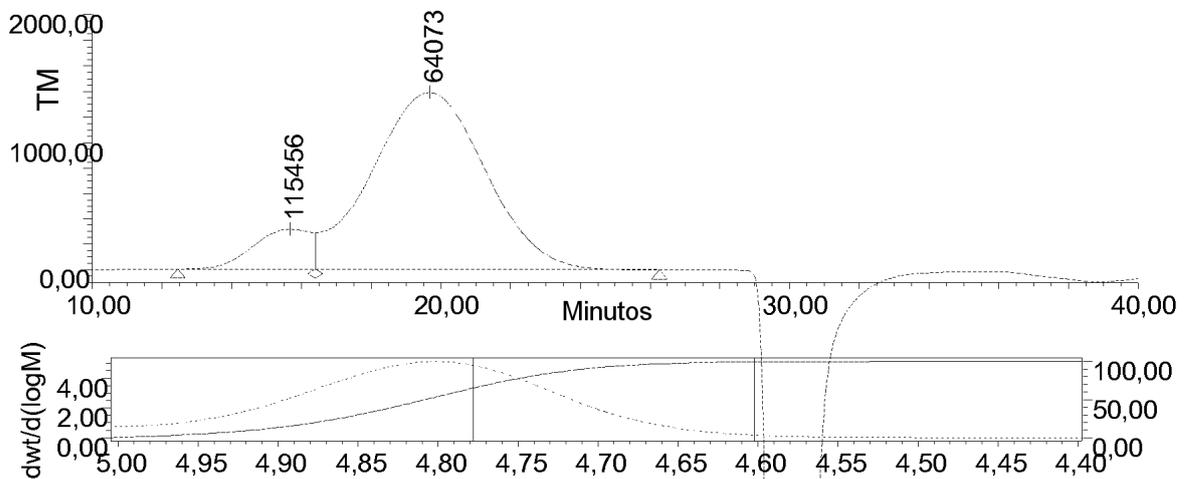


FIGURA 6

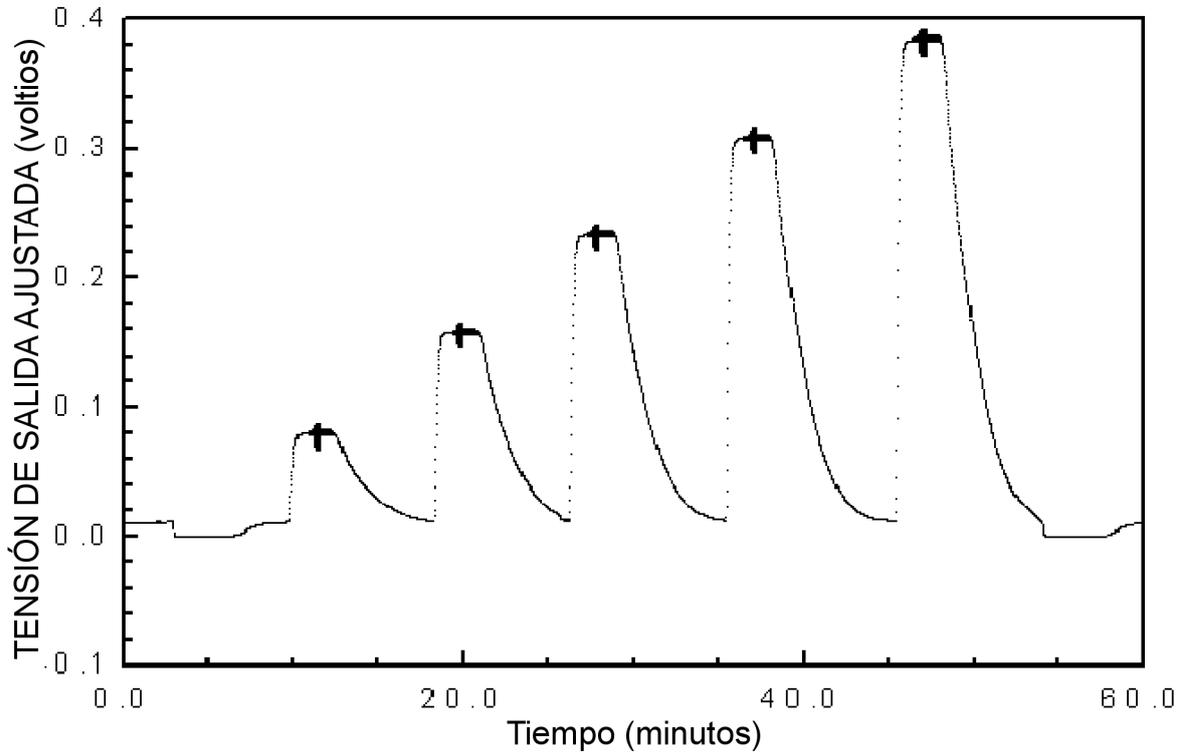


FIGURA 7

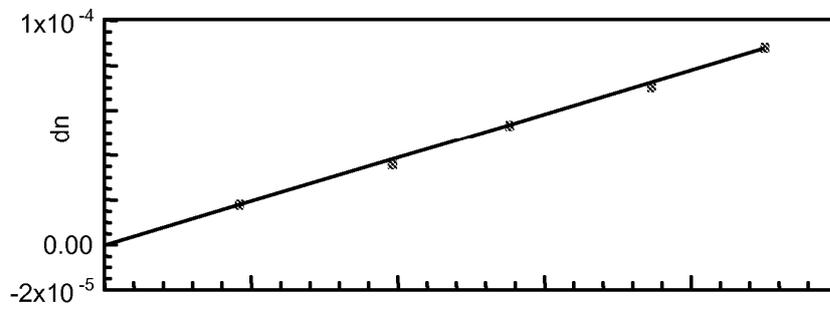


FIGURA 8

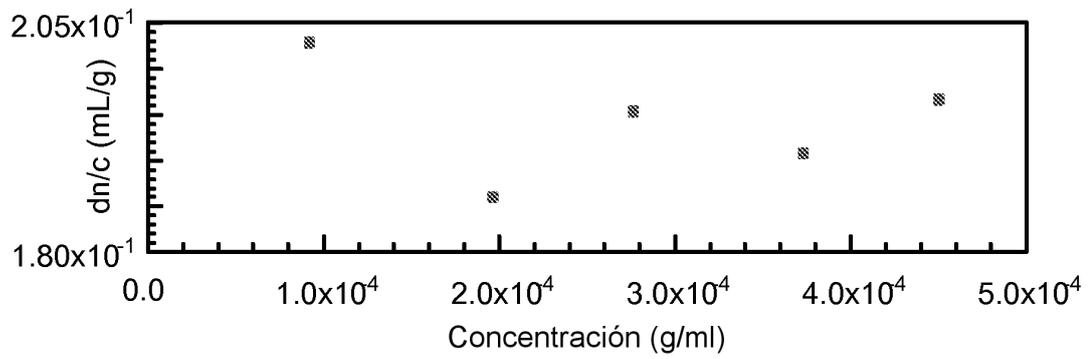


FIGURA 9

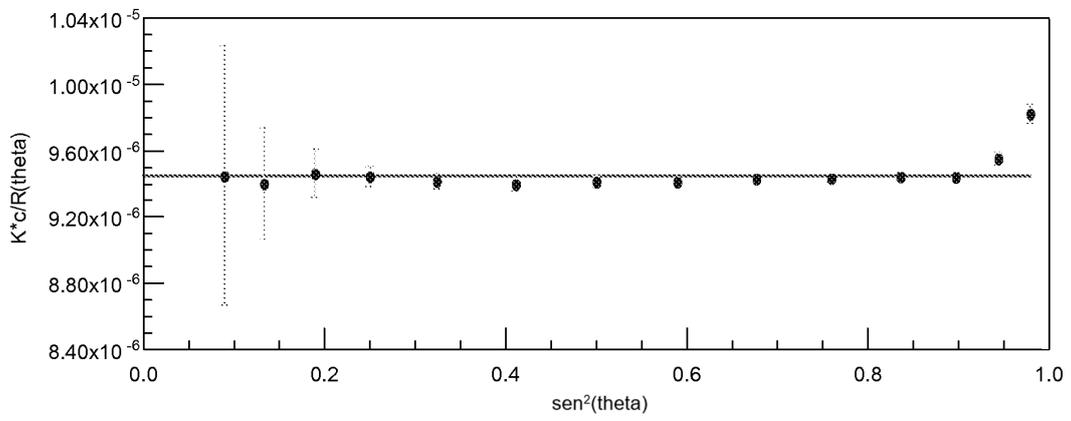


FIGURA 10

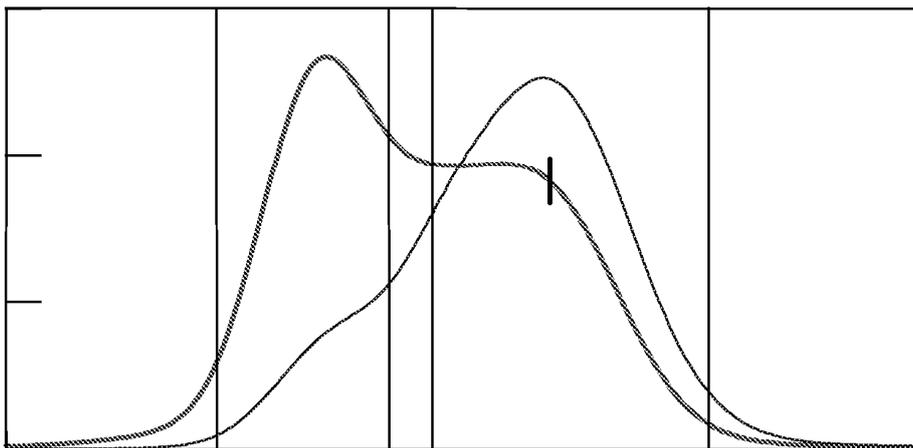


FIGURA 11

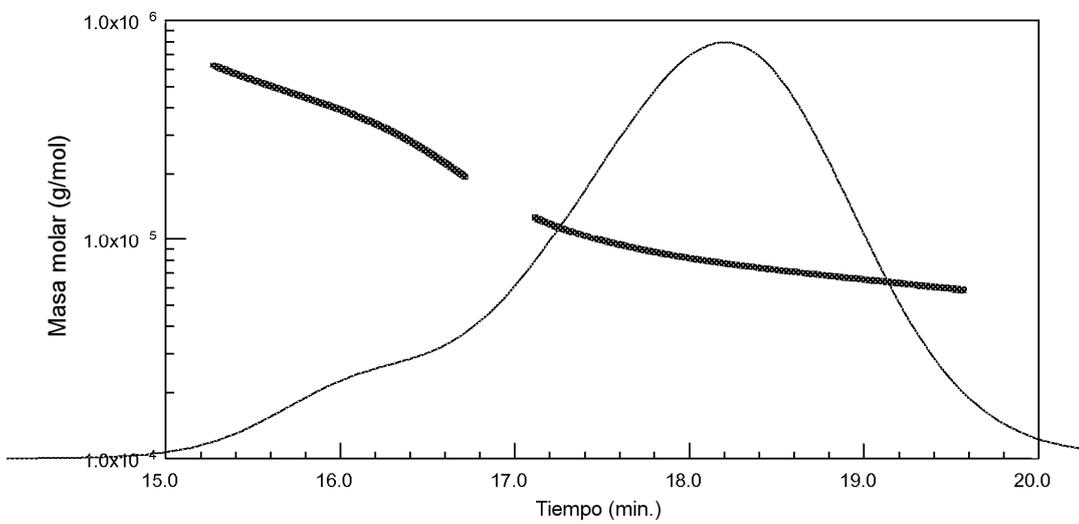


FIGURA 12

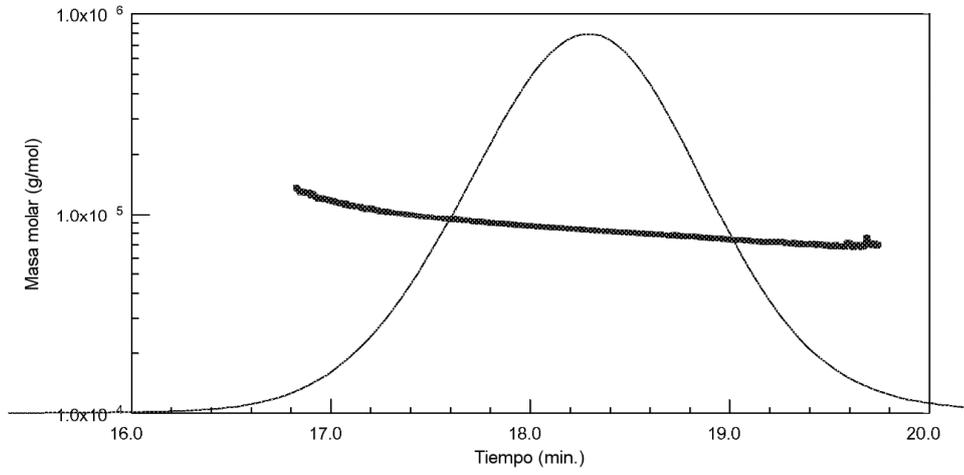


FIGURA 13

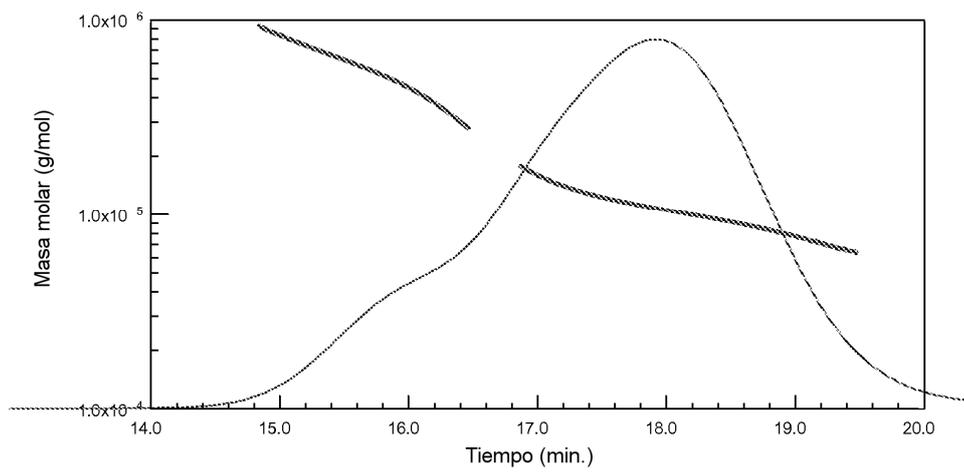


FIGURA 14

