

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 169**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2015 PCT/IB2015/050919**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15121783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2015 E 15710001 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3104886**

54 Título: **Conjugados glucoproteicos inmunogénicos**

30 Prioridad:

14.02.2014 US 201461939845 P

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

21.02.2019

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**GU, JIANXIN;
KAINTHAN, RAJESH KUMAR;
KIM, JIN-HWAN;
PRASAD, AVVARI KRISHNA y
YANG, YU-YING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 701 169 T3

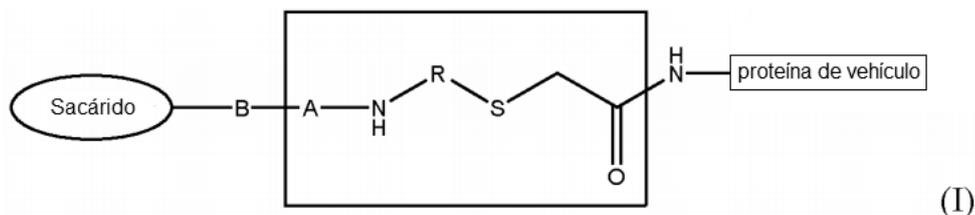
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Conjugados glucoproteicos inmunogénicos

Campo de la invención

5 La invención se refiere de manera general a glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) ("oxo-eT" en lo sucesivo en el presente documento), no siendo dicho espaciador el espaciador 2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC), teniendo la fórmula general (I)



10 en la que B, A y R tienen el significado indicado en las reivindicaciones adjuntas, a composiciones inmunogénicas que comprenden tales glucoconjugados, y a procedimientos para la preparación y el uso de tales glucoconjugados y composiciones inmunogénicas.

Antecedentes de la invención

15 La estrategia para aumentar la inmunogenicidad de las moléculas poco inmunogénicas mediante la conjugación es estas moléculas con moléculas de "vehículo" se ha utilizado con éxito durante décadas (véase, por ejemplo, Goebel y col. (1939) J. Exp. Med. 69: 53). Por ejemplo, se han descrito muchas composiciones inmunogénicas en las que los polímeros capsulares purificados se han conjugado con proteínas de vehículo para crear composiciones inmunogénicas más eficaces al explotar este "efecto de vehículo". Schneerson y col. (1984) Infect. Immun. 45: 582-591). También se ha demostrado que la conjugación sorte la respuesta deficiente de los anticuerpos que normalmente se observa en lactantes cuando se inmunizan con un polisacárido libre (Anderson y col. (1985) J. Pediatr. 107: 346; Insel y col. (1986) J. Exp. Med. 158: 294).

El documento US2007141077 desvela conjugados inmunogénicos de polisacárido-proteína que tienen un antígeno de polisacárido conjugado con una proteína estafilocócica de vehículo de adhesina de superficie.

25 El documento WO2008157590 se refiere a glucoconjugados inmunogénicos que comprenden uno o más oligosacáridos o polisacáridos que se conjugan con una o más proteínas de vehículo a través de un grupo aldehído activo.

El documento WO2007071707 desvela una composición inmunogénica de *Streptococcus pneumoniae* conjugada con 2 o más proteínas de vehículo diferentes.

30 El documento WO20140273012, técnica anterior en virtud del Art. 54(3) de la EPC desvela glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC).

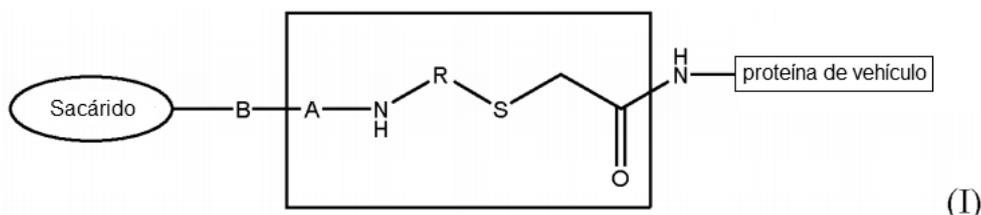
Los conjugados se han generado de manera exitosa usando diversos reactivos de reticulación o de acoplamiento, tales como reticuladores homobifuncionales, heterobifuncionales o de longitud cero. Actualmente hay muchos procedimientos disponibles para acoplar moléculas inmunogénicas, tales como sacáridos, proteínas y péptidos, a péptidos o vehículos de proteína. La mayoría de los procedimientos crean enlaces amina, amida, uretano, isotiurea o disulfuro, o en algunos casos, tioéteres. Una desventaja para el uso de reactivos de reticulación o de acoplamiento que introduce sitios reactivos en las cadenas laterales de las moléculas de aminoácidos reactivos en las moléculas de vehículo y/o inmunogénicas es que los sitios reactivos, si no se neutralizan, son libres para reaccionar con cualquier molécula indeseada, bien *in vitro* (posiblemente afectando, por lo tanto, de manera inversa a la funcionalidad o a la estabilidad de los conjugados) o *in vivo* (por lo tanto, presentando un posible riesgo de eventos adversos en personas o en animales inmunizados con las preparaciones). Dichos sitios reactivos en exceso se pueden hacer reaccionar o "tapar" para inactivar estos sitios, utilizando varias reacciones químicas conocidas, pero estas reacciones pueden ser perjudiciales de otro modo para la funcionalidad de los conjugados. Esto puede ser particularmente problemático cuando se intenta crear un conjugado introduciendo los sitios reactivos en la molécula de vehículo, dado que su mayor tamaño y su estructura más compleja (en relación con la molécula inmunogénica) puede hacerla más vulnerable a los efectos perturbadores del tratamiento químico. Por lo tanto, aun permanece la necesidad de nuevos procedimientos para preparar conjugados de proteína de vehículo tapada de manera apropiada, de manera que la funcionalidad del vehículo se conserve y el conjugado mantenga la capacidad para

generar la respuesta inmunitaria deseada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere de manera general a glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) (también denominado "oxo-eT" en lo sucesivo en el presente documento).

En un aspecto, la presente invención se refiere a glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) que tiene la fórmula general (I):



10 en la que:

A es un grupo $(C=X)_m$ en el que X es S u O y m es 0 o 1;

B es un enlace, O o CH_2 ; y cuando m es 0, B también puede ser $(C=O)$;

R se selecciona de los grupos que consisten en $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$, $(CH_2)_4$, $(CH_2)_5$, $(CH_2)_6$, $(CH_2)_7$, $(CH_2)_8$, $(CH_2)_9$ o $(CH_2)_{10}$; o

15 R se selecciona de los grupos que consisten en $O-CH_2$, $O-CH_2-CH_2$, $CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-(N-CH_3)-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $CH_2-CH_2-(N-CH_3)-CH_2-CH_2$ y $CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2$;

con la condición de que dicho espaciador no sea el espaciador (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC)

En realizaciones preferidas,

- 20
- B es O y A es $C(=O)$, o,
 - B es CH_2 y m es 0, o,
 - B es $C(=O)$ y m es 0, y/o
 - R se selecciona de los grupos que consisten en $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$, $(CH_2)_4$, $(CH_2)_5$, $(CH_2)_6$, $(CH_2)_7$, $(CH_2)_8$, $(CH_2)_9$ o $(CH_2)_{10}$.

25 En otras realizaciones preferidas,

- B es O y A es $C(=O)$, o,
 - B es CH_2 y m es 0, o,
 - B es $C(=O)$ y m es 0, y/o
 - R se selecciona de los grupos que consisten en $O-CH_2$, $O-CH_2-CH_2$, $CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-(N-CH_3)-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $CH_2-CH_2-(N-CH_3)-CH_2-CH_2$ y $CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2$.
- 30

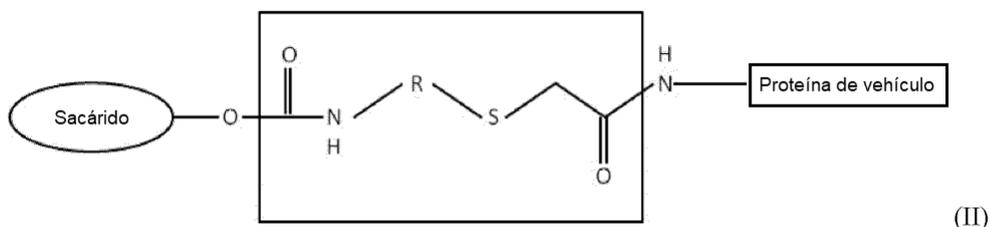
Los glucoconjugados de la presente invención comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) (también denominado "oxo-eT" en lo sucesivo en el presente documento) con la condición de que dicho espaciador no es el espaciador (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC) (es decir, $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$).

La invención adicionalmente se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden tales glucoconjugados, y a procedimientos para la preparación y el uso de tales glucoconjugados y composiciones inmunogénicas.

En un aspecto, la presente invención se dirige a procedimientos de preparación de glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un enlazador bivalente heterobifuncional citado en el presente documento como un espaciador ((2-oxoetil)tio) u "oxo-eT".

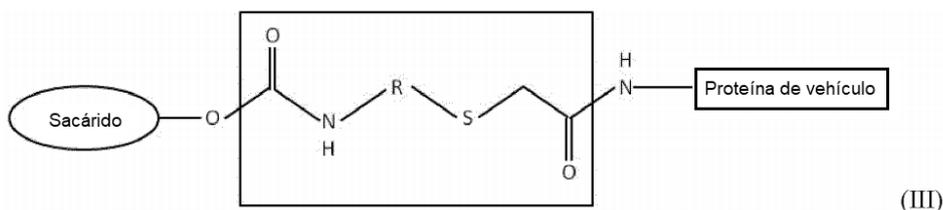
En algunas realizaciones, los glucoconjugados enlazados a oxo-eT de la invención tienen las siguientes fórmulas

1. un glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC) que tiene la fórmula (II)



en la que R es $(\text{CH}_2)_n$ en la que n es 3 a 10;

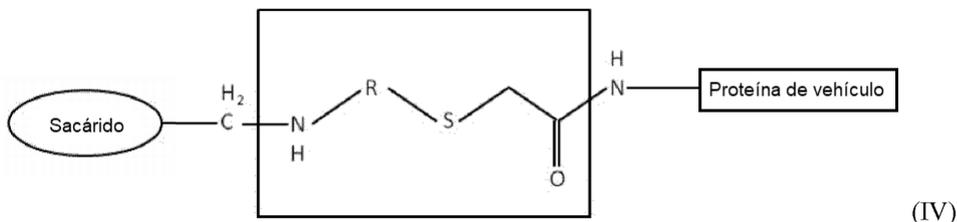
2. un glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC), que tiene la siguiente fórmula (III):



5

en la que R es selecciona de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ o $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$;
en la que n se selecciona de 1 a 10 y m se selecciona de 1 a 4.

3. un glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)amina (oxo-eTAAN) que tiene la fórmula (IV):



10

en la que R se selecciona de $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ o $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$; en la que n se selecciona de 1 a 10 y m se selecciona de 1 a 4;

En una realización preferida, la invención se refiere a un glucoconjugado de fórmula (I), (II), (III) o (IV) en la que R se selecciona de

15

- $(\text{CH}_2)_n$ en la que n se selecciona de 3 a 10;
- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ en la que m se selecciona de 1 a 3;
- $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$ en la que n se selecciona de 1 a 8;
- $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$ en la que n se selecciona de 1 a 8;
- $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ en la que m es 1 o 2,
- $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ en la que n se selecciona de 1 a 8 o,
- $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ en la que m es 1 o 2.

20

En los glucoconjugados definidos anteriormente que comprenden un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) como parte de la unión estructural entre un sacárido y una proteína o péptido de vehículo, dicho espaciador proporciona enlaces tioéter y amida estables.

25

Los glucoconjugados de la presente invención comprenden un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) como parte de la unión estructural entre un sacárido y una proteína o péptido de vehículo, dicho espaciador proporciona enlaces tioéter y amida estables. Además, se prefiere que dicho espaciador sea relativamente corto para reducir el riesgo de generar una respuesta inmunitaria frente a la parte del espaciador del conjugado. Una respuesta inmunitaria frente a la parte del espaciador del conjugado no es deseable y un espaciador corto tiene el beneficio de minimizar dicho

30

riesgo. Por lo tanto, en una realización, los glucoconjugados de la presente invención comprenden un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) en el que el número de átomos de ese espaciador (por ejemplo, contenido en el cuadro central de las fórmulas I, II, III o IV) es de 25 átomos o menos. Preferentemente, el número de átomos de ese espaciador (por ejemplo, contenido en el cuadro central de las fórmulas I, II, III o IV) es de 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, o 6 átomos. Incluso más preferentemente, el número de átomos de ese espaciador (por ejemplo, contenido en el cuadro central de las fórmulas I, II, III o IV) es de 15 o menos (tal como 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 o 6 átomos).

La invención proporciona adicionalmente glucoconjugados enlazados con oxo-eT, composiciones inmunogénicas que los comprenden y procedimientos para el uso de tales glucoconjugados y composiciones inmunogénicas.

En un aspecto, la invención proporciona un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eTAC, en el que el sacárido se une de manera covalente al espaciador de oxo-eTAC a través de una unión de carbamato, y en el que la proteína de vehículo se une de manera covalente al espaciador oxo-eTAC a través de una unión de tioéter y amida, con la condición de que dicho espaciador no sea el espaciador (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC) (es decir, $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$).

En un aspecto, para la generación del espaciador oxo-eTAC en el conjugado, los enlazadores preferidos usados en el presente documento son mercaptopropionilhidrazida (MPH, n=2), Dihidrocloreuro de dimetiléster de L-cistina (n=1) y 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol (AEET, n=2) y hidrocloreuro de 4-amino-1-butanotiol (n=4).

En otro aspecto, la invención proporciona un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eTAA, en el que el sacárido se une de manera covalente al espaciador de oxo-eTAA a través de una unión de amina, y en el que la proteína de vehículo se une de manera covalente al espaciador oxo-eTAA a través de una unión de tioéter y amida.

En algunas realizaciones, el sacárido es un polisacárido, tal como un polisacárido capsular que deriva de bacterias, en particular, de bacterias patógenas. En otras realizaciones, el sacárido es un oligosacárido o un monosacárido. Las proteínas de vehículo incorporadas en los glucoconjugados de la invención se seleccionan del grupo de proteínas de vehículo generalmente adecuadas para tales fines, tal como se describe en detalle en el presente documento o como es sabido por los expertos en la materia. En realizaciones particulares, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eTAC, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un derivado de ácido carbónico o derivado de cianógeno para producir un sacárido activado; b) hacer reaccionar el sacárido activado con un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol (como formas de tiol protegidas o libres, por ejemplo, DL-cistina o DL-cisteína o una sal de los mismos, o mercaptopropionilhidrazida, o 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol, o 4-amino-1-butanotiol o una sal de los mismos), para producir un sacárido tiolado; c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente desprotector o reductor (si el tiol está protegido) para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres; d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α -haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado; mediante el cual se produce en un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAC.

En realizaciones frecuentes, la etapa a) se realiza en un disolvente orgánico.

En realizaciones frecuentes, el derivado de ácido carbónico es 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) o disuccinimidil carbonato (DSC) o N-hidroxisuccinimidil cloroformato. Preferentemente, el derivado de ácido carbónico es CDT y el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, tal como dimetilsulfóxido (DMSO). En realizaciones preferidas, el sacárido tiolado se produce mediante la reacción del sacárido activado con un reactivo de tioalquilamina heterobifuncional o una sal del mismo. Los glucoconjugados enlazados a oxo-eTAC producidos por los procedimientos de la invención se pueden representar por las fórmulas generales (II y III).

En realizaciones frecuentes, el primer reactivo de tapado es N-acetil-L-cisteína, que reacciona con grupos α -haloacetamida no conjugados en restos de lisina de la proteína de vehículo para formar un resto de S-carboximetilcisteína (CMC) unido covalentemente al resto de lisina activado a través de un enlace tioéter. En otras realizaciones, el segundo reactivo de tapado es yodoacetamida (IAA), que reacciona con los grupos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado para proporcionar una tioacetamida tapada. Con frecuencia, la etapa e) comprende el tapado con un primer reactivo de tapado y con un segundo reactivo de tapado. En determinadas realizaciones, la etapa e) comprende el tapado con N-acetil-L-cisteína como el primer reactivo de tapado e IAA como el segundo reactivo de tapado.

En algunas realizaciones, la etapa de tapado e) comprende adicionalmente la reacción con un agente de reducción, por ejemplo, DTT, TCEP o mercaptoetanol, tras la reacción con el primer y/o el segundo reactivo de tapado.

En algunas realizaciones, la etapa d) comprende adicionalmente proporcionar una proteína de vehículo activa que comprende uno o más grupos de α -haloacetamida antes de hacer reaccionar el sacárido tiolado activo con la

proteína de vehículo activada. En realizaciones frecuentes, la proteína de vehículo activa comprende uno o más grupos α -bromoacetamida.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eTAAN, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un reactivo oxidante para generar grupos aldehído para producir un sacárido activado; b) hacer reaccionar el sacárido activado con un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol (en formas protegidas o libres) del extremo amino del enlazador, para producir un sacárido tiolado mediante aminación reductiva; c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente desprotector o un agente reductor (si el tiol está protegido) para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres; d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α -haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado; mediante el cual se produce en un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAAN. Los glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAN producidos por los procedimientos de la invención se pueden representar por la fórmula general (IV).

En una realización preferida de lo anterior para la generación del polisacárido tiolado, los grupos hidroxilo primarios del polisacárido se oxidan mediante el sistema de reactivos 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO)/N-Clorosuccinimida (NCS) (véase la Figura 2 o el número de solicitud PCT/IB2013/060933), antes de la reacción adicional con el extremo amino del enlazador eTAAN.

En otro aspecto, la invención proporciona un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT producido de acuerdo con cualquiera de los procedimientos desvelados en el presente documento.

Para cada uno de los aspectos de la invención, en realizaciones particulares de los procedimientos y de las composiciones descritas en el presente documento, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un sacárido que es un polisacárido capsular bacteriano, en particular, un polisacárido capsular derivado de bacterias patógenas.

A modo de ejemplo, el polisacárido puede ser de bacterias Gram negativas seleccionadas del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *H. influenzae*, *Klebsiella*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Porphyromonas - A -gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y *Vibrio cholera*. El polisacárido puede ser de bacterias Gram positivas del grupo que consiste en: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus Grupo A*, *Streptococcus Grupo B*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus pneumoniae*.

En algunas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular neumocócico (Pn) derivado de *Streptococcus pneumoniae*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 33F y 35B. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 2, 9N, 15A, 17F, 20, 23A, 23B y 35B.

En otras de estas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular meningocócico (Mn) derivado de *Neisseria meningitidis*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de Mn es el polisacárido capsular del serotipo de Mn X.

En otras de estas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus Grupo B (GBS)*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de GBS se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib, II, III o V.

En otras de estas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de *Staphylococcus aureus*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de *S. aureus* es el polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8.

En otras de estas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de bacterias de *Enterococcus*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de *Enterococcus* es el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

En realizaciones particularmente preferidas, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de Pn o Mn o GBS o de *S. aureus* o de *Enterococcus*, conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador oxo-eT.

Las composiciones y los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, los glucoconjugados de la invención se pueden usar en la producción de composiciones inmunogénicas que comprenden un glucoconjugado enlazado a oxo-eT. Tales composiciones inmunogénicas se pueden usar para proteger a los receptores frente a infecciones bacterianas, por ejemplo, de bacterias patógenas tales como *S. pneumonia* o *N. meningitidis* o *GBS* o *S. aureus* o *Enterococcus*.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente,

vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables en la que el glucoconjugado comprende un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT, tal como se describe en el presente documento.

En realizaciones frecuentes, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano.

En algunas de tales realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular de Pn derivado de *S. pneumoniae*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 33F y 35B. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 2, 9N, 15A, 17F, 20, 23A, 23B y 35B.

En otras de estas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular de Mn derivado de *N. meningitidis*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular de Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de Mn es el polisacárido capsular del serotipo de Mn X.

En otras de estas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus Grupo B* (GBS). En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de GBS se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib, II, III o V.

En otras de estas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de *Staphylococcus aureus*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de *S. aureus* es el polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8.

En otras de estas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de bacterias de *Enterococcus*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de *Enterococcus* es el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

En realizaciones preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de Pn o Mn o GBS o de *S. aureus* o de *Enterococcus*, conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador oxo-eT.

En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénicas comprenden un adyuvante. En algunas de tales realizaciones, el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento comprenden el adyuvante de fosfato de aluminio.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de prevención, tratamiento o mejora de una infección bacteriana, de una enfermedad o de una afección en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la invención, en la que dicha composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano.

En una realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con bacterias de *S. pneumonia* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular de Pn. En otra realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con bacterias de *N. meningitidis* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular de Mn. En otra realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con bacterias de *Streptococcus Grupo B* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular de GBS. En otra realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con bacterias de *S. aureus* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular de *S. aureus*. En otra realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium* y el glucoconjugado comprende, respectivamente, un polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o uno de *Enterococcus faecium*.

5 En otros aspectos, la invención proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria frente a las bacterias patógenas; un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad o afección causada por bacterias patógenas; y un procedimiento para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una infección, enfermedad o afección causada por bacterias patógenas, en cada caso mediante la administración a un sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano derivado de las bacterias patógenas.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano. En realizaciones preferidas, el procedimiento implica la producción de una respuesta inmunitaria protectora en el sujeto, tal como se describe en detalle en el presente documento.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT a un sujeto para generar una respuesta inmunitaria protectora en el sujeto, tal como se describe en detalle en el presente documento.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo generado en respuesta al glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la presente invención, o una composición inmunogénica que comprende tal glucoconjugado. Tales anticuerpos se pueden usar en investigación y en ensayos clínicos de laboratorio, tales como la detección y el serotipado de bacterias, o se pueden usar para conferir inmunidad pasiva a un sujeto.

25 En otro aspecto más, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la presente invención, para su uso en la prevención, en el tratamiento o en la mejora de la infección bacteriana, por ejemplo, infección por bacterias *S. pneumonia* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*).

30 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la presente invención, para la preparación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o la mejora de la infección bacteriana, por ejemplo, infección por bacterias *S. pneumonia* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*).

35 En determinadas realizaciones preferidas de los procedimientos terapéuticos y/o profilácticos y usos descritos anteriormente, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano unido de manera covalente a una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT. En realizaciones frecuentes de los procedimientos y de los usos descritos en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular de Pn o un polisacárido capsular de Mn o un polisacárido capsular de GBS o un polisacárido de *S. aureus* o un polisacárido de bacterias de *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*). En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 33F y 35B. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 2, 9N, 15A, 17F, 20, 23A, 23B y 35B. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular de Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular de GBS se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib, II, III o V.

50 En determinadas realizaciones de los procedimientos terapéuticos y/o profilácticos y usos descritos anteriormente, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano unido de manera covalente a una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT. En determinadas realizaciones de los procedimientos y de los usos descritos en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular de *S. aureus*. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular de *S. aureus* es el polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8.

55 En determinadas realizaciones de los procedimientos terapéuticos y/o profilácticos y usos descritos anteriormente, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano unido de manera covalente a una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT. En determinadas realizaciones de los procedimientos y de los usos descritos en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular bacteriano de *Enterococcus*. En otras de estas realizaciones, el

polisacárido capsular de bacterias de *Enterococcus* es el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

5 En determinadas realizaciones preferidas, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇. En realizaciones particularmente preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de Pn o Mn o GBS o de *S. aureus* o un polisacárido de bacterias de *Enterococcus* (tal como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*), conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador oxo-eT.

Breve descripción de los dibujos

10 La **Figura 1** muestra un esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAC de la invención, para un glucoconjugado que comprende un polisacárido conjugado de manera covalente con la CRM₁₉₇.

La **Figura 2** muestra un esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAA de la invención, para un glucoconjugado que comprende un polisacárido conjugado de manera covalente con la CRM₁₉₇.

15 La **Figura 3** muestra un esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAA de la divulgación, para un glucoconjugado que comprende un polisacárido conjugado de manera covalente con la CRM₁₉₇.

20 La **Figura 4** muestra un esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAA de la divulgación, usando un derivado de tiazolidinonetona, para un glucoconjugado que comprende un polisacárido conjugado de manera covalente con la CRM₁₉₇.

La **Figura 5** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular del serotipo 33F (Pn-33F) de *S. pneumoniae*.

La **Figura 6** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular del serotipo 22F (Pn-22F) de *S. pneumoniae*.

25 La **Figura 7** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular del serotipo 10A (Pn-10A) de *S. pneumoniae*.

La **Figura 8** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular del serotipo 11A (Pn-11A) de *S. pneumoniae*.

Descripción detallada

30 La presente invención se puede entender más fácilmente en referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los ejemplos incluidos en el presente documento. Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la materia a la que la invención pertenece entiende habitualmente. Aunque cualquiera de los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o en el ensayo de la presente invención, en el presente documento se describen determinados procedimientos y materiales preferidos. En la descripción de las realizaciones y en las reivindicaciones de la invención, se usará determinada terminología de acuerdo con las definiciones que figuran a continuación.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias plurales salvo se indique otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento, y las referencias a "un espaciador oxo-eT" se refieren a uno o más espaciadores eT, como será evidente para un experto en la materia al leer la divulgación.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor, tal como un intervalo de concentración establecido, marco temporal, peso molecular, temperatura o pH. Tal intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, típicamente en el 20 %, más típicamente en el 10 % e incluso más típicamente en el 5 % del intervalo o valor indicado. A veces, tal intervalo puede estar dentro del error experimental típico de los procedimientos convencionales usados para la medición y/o para la determinación de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por el término "aproximadamente" dependerá del sistema particular bajo estudio, y la puede apreciar fácilmente un experto en la materia. Cuando se indique un intervalo en la presente solicitud, cada número entero completo en el intervalo también se contempla como una realización de la invención.

Cabe destacar que en la presente divulgación, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener el significado atribuido a los mismos en la ley de patentes de los EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares. Tales términos se refieren a la inclusión de un ingrediente particular o de un conjunto de ingredientes sin excluir cualquiera de los

otros ingredientes. Las expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado atribuido a los mismos en la ley de patentes de los EE.UU., por ejemplo, permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no resten valor a las características nuevas o básicas de la invención, es decir, excluyen ingredientes o etapas adicionales no indicados que resten valor a las características nuevas o básicas de la invención. Las expresiones "consiste en" y "que consiste en" tienen el significado atribuido a los mismos en la ley de patentes de EE.UU.; es decir que estas expresiones son cerradas. Por consiguiente, estos términos se refieren a la inclusión de un ingrediente particular o de un conjunto de ingredientes y la exclusión de los otros ingredientes.

El término "sacárido" tal como se usa en el presente documento se puede referir a un polisacárido, un oligosacárido o un monosacárido. Frecuentemente, las referencias a un sacárido se refieren a un polisacárido capsular bacteriano, en particular, los polisacáridos capsulares derivados de bacterias patógenas tales como *S. pneumoniae* o *N. meningitis* o *GBS* o *S. aureus* o una bacteria de *Enterococcus* (tal como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*).

Los términos "conjugado" o "glucoconjugado" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo. Los glucoconjugados de la presente invención a veces se citan en el presente documento como glucoconjugados "enlazados a oxo-eT", que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de al menos un espaciador oxo-eT. Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT de la invención y las composiciones inmunogénicas que los comprenden pueden contener alguna cantidad de sacáridos libres.

La expresión "sacárido libre" tal como se usa en el presente documento se refiere a un sacárido que no está conjugado de manera covalente con la proteína de vehículo o a un sacárido que está unido de manera covalente a muy pocas proteínas de vehículo unidas en una proporción alta de sacárido/proteína (>5:1) pero sin embargo está presente en la composición de glucoconjugado. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente con (es decir, unido de manera no covalente a, adsorbido a, o atrapado en o con) el glucoconjugado de proteína de vehículo-sacárido conjugado.

Las expresiones "polisacárido libre" y "polisacárido capsular libre" se pueden usar en el presente documento para transmitir el mismo significado con respecto a glucoconjugados en los que el sacárido es un polisacárido o un polisacárido capsular, respectivamente.

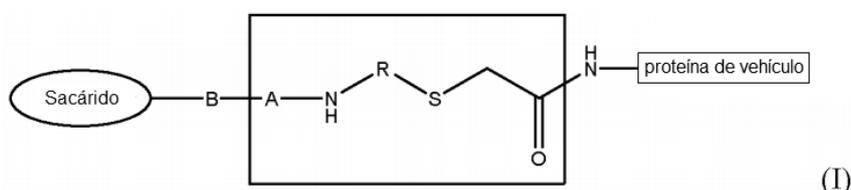
Tal como se utiliza en el presente documento, "conjuguar", "conjugado" y "conjugación" se refiere a un procedimiento mediante el cual un sacárido, por ejemplo, un polisacárido capsular bacteriano, se une covalentemente a una molécula de vehículo o a una proteína de vehículo. En los procedimientos de la presente invención, el sacárido está conjugado de manera covalente con la proteína de vehículo a través de al menos un espaciador oxo-eT. La conjugación se puede realizar de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación o mediante otros procedimientos conocidos en la materia. La conjugación con una proteína de vehículo mejora la inmunogenicidad de un polisacárido capsular bacteriano.

Glucoconjugados

La presente invención se refiere a glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de uno o más espaciadores oxo-eT, en el que el sacárido se conjuga de manera covalente con el espaciador oxo-eT a través de un carbamato o una amina o un enlace amida y en el que la proteína de vehículo se conjuga de manera covalente con el espaciador oxo-eT a través de un enlace de tioéter y amida.

Además de la presencia de uno o más espaciadores oxo-eT, las nuevas características de los glucoconjugados de la presente invención incluyen los perfiles de peso molecular de los sacáridos y los glucoconjugados enlazados a oxo-eT resultantes, la proporción de lisinas conjugadas por proteína de vehículo y el número de lisinas unidas de manera covalente al polisacárido a través del(los) espaciador(es) oxo-eT, el número de enlaces covalentes entre la proteína de vehículo y el sacárido como una función de unidades de repetición del sacárido, y la cantidad relativa de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido.

Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT de la invención se pueden representar mediante la fórmula general (I), tal como se ilustra a continuación:



en la que:

A es un grupo $(C=X)_m$ en el que X es S u O y m es 0 o 1;

B es un enlace, O o CH_2 ; y cuando m es 0, B también puede ser $(C=O)$;

5 R se selecciona de los grupos que consisten en $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$, $(CH_2)_4$, $(CH_2)_5$, $(CH_2)_6$, $(CH_2)_7$, $(CH_2)_8$, $(CH_2)_9$ o $(CH_2)_{10}$; o

R se selecciona de los grupos que consisten en $O-CH_2$, $O-CH_2-CH_2$, $CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $O-CH_2-CH_2-(N-CH_3)-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$, $CH_2-CH_2-(N-CH_3)-CH_2-CH_2$ y $CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2$;

con la condición de que dicho espaciador no sea el espaciador (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC).

10 El espaciador oxo-eTAC proporciona enlaces estables de carbamato, tioéter y amida entre el sacárido y la proteína de vehículo. La síntesis del glucoconjugado enlazado a oxo-eTAC implica la reacción de un grupo hidroxilo activado del sacárido con el grupo amino de un reactivo de tioalquilamina, formando un enlace carbamato con el sacárido para proporcionar un sacárido tiolado. La generación de uno o más grupos sulfhidrilo libres se realiza mediante la reacción con un agente reductor para proporcionar un sacárido tiolado activo (si el tiol está protegido).

15 La reacción de los grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activo con una proteína de vehículo activa que tiene uno o más grupos α -haloacetamida sobre restos que contienen amina genera un enlace tioéter para formar el conjugado, en el que la proteína de vehículo se une al espaciador oxo-eTAC a través de un enlace de un tioéter y una amida.

20 El espaciador oxo-eTAAN, uno de los subgrupos de los espaciadores eT, proporciona enlaces estables de amina, tioéter y amida entre el sacárido y la proteína de vehículo. El sacárido primero se activa mediante la oxidación de grupos diol adyacentes con peryodato o la oxidación de grupos hidroxilo primarios con una combinación de TEMPO y un oxidante para producir grupos aldehído. La oxidación de los grupos hidroxilo primarios se prefiere sobre la oxidación de peryodato, dado que no implica la escisión de la cadena, lo que lleva a una modificación mínima del epítipo. La síntesis del glucoconjugado enlazado a oxo-eTAAN implica la reacción de un aldehído del sacárido activado con el grupo amino de un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol, formando un enlace amina con el sacárido para proporcionar un sacárido tiolado. La generación de uno o más grupos sulfhidrilo libres se realiza mediante la reacción con un agente reductor para proporcionar un sacárido tiolado activo (si el tiol está protegido). La reacción de los grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activo con una proteína de vehículo activa que tiene uno o más grupos α -haloacetamida sobre restos que contienen amina genera un enlace tioéter para formar el conjugado, en el que la proteína de vehículo se une al espaciador oxo-eTAAN a través de un enlace de un tioéter y una amida.

30 El espaciador oxo-eTAAD, uno de los subgrupos de los espaciadores oxo-eT, proporciona enlaces estables de tioéter y amida entre el sacárido y la proteína de vehículo. La síntesis del glucoconjugado enlazado a oxo-eTAAD implica la reacción de un grupo carboxilo activo del sacárido con el grupo amino de un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol, formando un enlace amida con el sacárido para proporcionar un sacárido tiolado. La generación de uno o más grupos sulfhidrilo libres se realiza mediante la reacción con un agente reductor para proporcionar un sacárido tiolado activo (si el tiol está protegido). La reacción de los grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activo con una proteína de vehículo activa que tiene uno o más grupos α -haloacetamida sobre restos que contienen amina genera un enlace tioéter para formar el conjugado, en el que la proteína de vehículo se une al espaciador oxo-eTAAD a través de un enlace de un tioéter y una amida.

En glucoconjugados de la invención, el sacárido puede ser un polisacárido, un oligosacárido o un monosacárido, y la proteína de vehículo se puede seleccionar de cualquier vehículo adecuado tal como se describe en detalle en el presente documento o es sabido por los expertos en la materia. En realizaciones frecuentes, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano. En algunas de tales realizaciones, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇.

45 En algunas de tales realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular Pn derivado de *S. pneumoniae*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otras realizaciones, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 33F y 35B. En otras realizaciones, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 2, 9N, 15A, 17F, 20, 23A, 23B y 35B. En otras realizaciones, el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 10A, 11A, 22F y 33F. En una de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-33F. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-22F. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-10A. En otra más de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-11A.

- En otras realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular Mn derivado de *N. meningitidis*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y. En una de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-A. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-C. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-W135. En otra más de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-Y. En otra realización específica, el polisacárido capsular de Mn es el polisacárido capsular del serotipo de Mn X.
- En otras realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular de GBS derivado de *Streptococcus* Grupo B. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de GBS se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V. En una de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular GBS-Ia. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular GBS-Ib. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular GBS-II. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular GBS-III. En otra más de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular GBS-V.
- En otras realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de *Staphylococcus aureus*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de *S. aureus* es el polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8.
- En otras realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular derivado de bacterias de *Enterococcus*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular de *Enterococcus* es el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.
- En realizaciones particularmente preferidas, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un sacárido que es un polisacárido capsular bacteriano de Pn o Mn, tal como un polisacárido capsular de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F o un polisacárido capsular de los serotipos de Mn A, C, W135 o Y, o un polisacárido capsular de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III o V, que está conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador oxo-eT.
- En otras realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende un polisacárido capsular bacteriano de *S. aureus* o de *Enterococcus*, tal como el polisacárido capsular de *S. aureus* serotipo 5 u 8, o el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*, que está conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador oxo-eT.
- En algunas realizaciones, los glucoconjugados enlazados a oxo-eT de la presente invención comprenden un sacárido conjugado de manera covalente a la proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT, en el que el sacárido tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En más de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. En algunas de tales realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F o un polisacárido capsular de los serotipos de Mn A, C, W135 o Y, o un polisacárido capsular de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III o V, en el que el polisacárido capsular tiene un peso molecular que está dentro de cualquiera de los intervalos de peso molecular tal como se describe. En algunas otras realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, el polisacárido capsular de *S. aureus* serotipo 5 u 8) o el polisacárido capsular de una bacteria de *Enterococcus* (tal como el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*) en el que el polisacárido capsular tiene un peso molecular que cae dentro de cualquiera de los intervalos de pesos moleculares tal como se describe.
- En algunas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la invención tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones más, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa y 3.000 kDa.
- En realizaciones adicionales, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la invención tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 20.000 kDa; entre 200 kDa y 15.000 kDa; entre 200 kDa y 10.000 kDa; entre 200 kDa y 7.500 kDa; entre 200 kDa y 5.000 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 500 kDa y 20.000 kDa; entre 500 kDa y 15.000 kDa; entre 500 kDa y 12.500 kDa; entre 500 kDa y 10.000 kDa; entre 500 kDa y 7.500 kDa; entre 500 kDa y 6.000 kDa; entre 500 kDa y 5.000 kDa; entre 500 kDa y 4.000 kDa; entre 500 kDa y 3.000 kDa; entre 500 kDa y 2.000 kDa; entre 500 kDa y 1.500 kDa; entre 500 kDa y 1.000 kDa; entre 750 kDa y 20.000 kDa; 750 kDa y 15.000 kDa; entre 750 kDa y 12.500 kDa; entre 750 kDa y 10.000 kDa; entre 750 kDa y 7.500 kDa; entre 750 kDa y

6.000 kDa; entre 750 kDa y 5.000 kDa; entre 750 kDa y 4.000 kDa; entre 750 kDa y 3.000 kDa; entre 750 kDa y 2.000 kDa; entre 750 kDa y 1.500 kDa; entre 1.000 kDa y 15.000 kDa; entre 1.000 kDa y 12.500 kDa; entre 1.000 kDa y 10.000 kDa; entre 1.000 kDa y 7.500 kDa; entre 1.000 kDa y 6.000 kDa; entre 1.000 kDa y 5.000 kDa; entre 1.000 kDa y 4.000 kDa; entre 1.000 kDa y 2.500 kDa; entre 2.000 kDa y 15.000 kDa; entre 2.000 kDa y 12.500 kDa; entre 2.000 kDa y 10.000 kDa; entre 2.000 kDa y 7.500 kDa; entre 2.000 kDa y 6.000 kDa; entre 2.000 kDa y 5.000 kDa; entre 2.000 kDa y 4.000 kDa; o entre 2.000 kDa y 3.000 kDa.

Otra forma de caracterizar los glucoconjugados enlazados a oxo-eT de la invención es mediante el número de restos de lisina en la proteína de vehículo que llegan a estar conjugados con el sacárido a través de un espaciador oxo-eT, que se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas.

10 En realizaciones frecuentes, la proteína de vehículo está conjugada de manera covalente con el espaciador oxo-eT a través de un enlace amida con uno o más grupos ϵ -amino de restos de lisina en la proteína de vehículo. En algunas de tales realizaciones, la proteína de vehículo comprende de 2 a 20 restos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido. En otras de estas realizaciones, la proteína de vehículo comprende de 4 a 16 restos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido.

15 En una realización preferida, la proteína de vehículo comprende CRM₁₉₇, que contiene 39 restos de lisina. En algunas de tales realizaciones, la CRM₁₉₇ puede comprender de 4 a 16 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que desde aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 41 % de las lisinas de CRM₁₉₇ están enlazadas covalentemente al sacárido. En otra de tales realizaciones, la CRM₁₉₇ puede comprender de 2 a 20 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido.

20 Otro modo de expresar este parámetro es que desde aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 50 % de las lisinas de CRM₁₉₇ están enlazadas covalentemente al sacárido.

Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT de la invención también se pueden caracterizar mediante la proporción (peso/peso) de sacárido frente a proteína de vehículo. En algunas realizaciones, la proporción de sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 0,2 y 4. En otras realizaciones, la proporción de sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 1,0 y 2,5. En realizaciones adicionales, la proporción de sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 0,4 y 1,7. En algunas de tales realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano y/o la proteína de vehículo es CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados también se pueden caracterizar por el número de enlaces covalentes entre la proteína de vehículo y el sacárido como una función de unidades de repetición del sacárido. En una realización, el glucoconjugado de la invención comprende al menos un enlace covalente entre la proteína de vehículo y el polisacárido por cada 4 unidades de repetición del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

En realizaciones frecuentes, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇ y el enlace covalente a través de un espaciador oxo-eT entre la CRM₁₉₇ y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

40 Una consideración importante durante la conjugación es el desarrollo de condiciones que permitan la retención de grupos funcionales de sustituyentes no sacáridos potencialmente sensibles de los componentes individuales, tales como las cadenas laterales de O-acilo, fosfato o glicerol fosfato que pueden formar parte del epítipo del sacárido.

En una realización, el glucoconjugado comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación entre el 10-100 %. En algunas de tales realizaciones, el sacárido tiene un grado de O-acetilación entre el 50-100 %. En otras de estas realizaciones, el sacárido tiene un grado de O-acetilación entre el 75-100 %. En realizaciones adicionales, el sacárido tiene un grado de O-acetilación mayor de o igual al 70 % (≥ 70 %).

Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacáridos libres que no están conjugados de manera covalente con la proteína de vehículo, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado de manera no covalente con (es decir, unido de manera no covalente a, adsorbido a, o atrapado en o con) el glucoconjugado.

En algunas realizaciones, el glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende menos de aproximadamente el 45 % de sacáridos libres, menos de aproximadamente el 40 % de sacáridos libres, menos de aproximadamente el 35 % de sacáridos libres, menos de aproximadamente el 30 % de sacáridos libres, menos de aproximadamente el 25 % de sacáridos libres, menos de aproximadamente el 20 % de sacáridos libres, menos de aproximadamente el 15 % de sacáridos libres, menos de aproximadamente el 10 % de sacáridos libres, o menos de aproximadamente el 5 % de sacáridos libres en relación con la cantidad total de sacárido. Preferentemente, el glucoconjugado comprende menos del 15 % de sacárido libre, más preferentemente menos del 10 % de sacáridos libres, y aún más preferentemente, menos del 5 % de sacárido libre.

En determinadas realizaciones preferidas, la invención proporciona un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular, preferentemente un polisacárido capsular de Pn o Mn, conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT, que tiene una o más de las siguientes características por separado o en combinación: el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa; el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa; la proteína de vehículo comprende de 2 a 20 restos de lisina enlazados de manera covalente al sacárido; la proporción sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 0,2 y 4; el glucoconjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína de vehículo y el polisacárido por cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido; el sacárido tiene un grado de O-acetilación entre el 75-100 %; el conjugado comprende menos de aproximadamente el 15 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total; la proteína de vehículo es CRM₁₉₇; el polisacárido capsular se selecciona de los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F, o el polisacárido capsular se selecciona de los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 o Y.

En determinadas realizaciones preferidas, la invención proporciona un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular, preferentemente un polisacárido capsular de Pn o Mn, conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT, que tiene una o más de las siguientes características por separado o en combinación: el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa; el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa; la proteína de vehículo comprende de 2 a 20 restos de lisina enlazados de manera covalente al sacárido; la proporción sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 0,2 y 4; el glucoconjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína de vehículo y el polisacárido por cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido; el sacárido tiene un grado de O-acetilación entre el 75-100 %; el conjugado comprende menos de aproximadamente el 15 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total; la proteína de vehículo es CRM₁₉₇; el polisacárido capsular se selecciona de los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III o V o el polisacárido capsular de los serotipos de *S. aureus* 5 u 8 o el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT también se pueden caracterizar por su distribución del tamaño molecular (K_d). El tamaño molecular de los conjugados se determina con medio de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC, del inglés *size exclusion chromatography*) con fase estacionaria de Sefarosa CL-4B usando el sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para la determinación de la K_d , primero se calibra la cromatografía para determinar el V_0 , que representa el volumen de vacío o el volumen de exclusión total, y V_i , el volumen al que las moléculas más pequeñas en la muestra eluyen, que también se conoce como volumen interpartícula. Toda la separación de la SEC tiene lugar entre el V_0 y el V_i . El valor de K_d para cada parte recogida se determina mediante la siguiente expresión $K_d = (V_e - V_i) / (V_i - V_0)$, en la que V_e representa el volumen de retención del compuesto. El % de fracción (pico principal) que eluye a $\leq 0,3$ define la K_d del conjugado (distribución del tamaño molecular). En algunas realizaciones, la invención proporciona glucoconjugados enlazados a oxo-eT que tienen una distribución de tamaño molecular (K_d) de ≥ 35 %. En otras realizaciones, la invención proporciona glucoconjugados enlazados a oxo-eT que tienen una distribución de tamaño molecular (K_d) de ≥ 15 %, ≥ 20 %, ≥ 25 %, ≥ 30 %, ≥ 35 %, ≥ 40 %, ≥ 45 %, ≥ 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, o ≥ 90 %.

Los glucoconjugados y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener restos sulfhidrilo libres. En algunos casos, los sacáridos tiolados activados formados por los procedimientos proporcionados en el presente documento contendrán múltiples restos sulfhidrilo libres, algunos de los cuales pueden no experimentar la conjugación covalente con la proteína de vehículo durante la etapa de conjugación. Tales restos sulfhidrilo libres residuales se tapan mediante la reacción con un agente de tapado reactivo a tiol, por ejemplo, yodoacetamida (IAA), para tapar la posible función reactiva. Otros agentes de tapado reactivos a tiol, por ejemplo, reactivos que contienen maleimida y similares, también se contemplan.

Además, los glucoconjugados enlazados a oxo-eT y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener proteína de vehículo no conjugada residual, que puede incluir proteína de vehículo activa que ha experimentado una modificación durante las etapas del procedimiento de tapado.

Los glucoconjugados de la invención se pueden usar en la producción de composiciones inmunogénicas para proteger a los receptores frente a infecciones bacterianas, por ejemplo, infección por bacterias patógenas tales como *S. pneumonia* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*). Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT, tal como se describe en el presente documento.

En realizaciones frecuentes, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano.

En algunas de tales realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular de Pn derivado de *S. pneumoniae*. En algunas realizaciones específicas, el

polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

5 En otras de estas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular de Mn derivado de *N. meningitidis*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular de Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y.

10 En otras de estas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular de GBS derivado de Streptococcus Grupo B. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular de GBS se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V.

En otras de estas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular de *S. aureus*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular de *S. aureus* es el polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8.

15 En otras de estas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular de bacterias de *Enterococcus*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular de bacterias de *Enterococcus* es el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

20 En realizaciones particularmente preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de Pn o Mn o GBS, conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador oxo-eT.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un adyuvante. En algunas de tales realizaciones, el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, la composición inmunogénica comprende el adyuvante fosfato de aluminio.

25 Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT de la invención y las composiciones inmunogénicas que los comprenden pueden contener alguna cantidad de sacáridos libres. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente el 45 %, menos de aproximadamente el 40 %, menos de aproximadamente el 35 %, menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 25 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 10 %, o menos de aproximadamente el 5

30 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido. Preferentemente, la composición inmunogénica comprende menos del 15 % de sacáridos libres, más preferentemente menos del 10 % de sacáridos libres, y aún más preferentemente, menos del 5 % de sacáridos libres. En otro aspecto, los glucoconjugados o las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden usar para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide mediante la eliminación de bacterias en un modelo de

35 eficacia animal o a través de un ensayo de eliminación opsonofagocítica. Los glucoconjugados de la invención que comprenden un polisacárido capsular bacteriano se pueden usar en la producción de anticuerpos frente a tal polisacárido capsular bacteriano. Tales anticuerpos se pueden usar posteriormente en investigación y en ensayos clínicos de laboratorio, tal como la detección y el serotipado de bacterias. Tales anticuerpos también se pueden usar para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos frente a los

40 polisacáridos bacterianos son funcionales en un modelo de eficacia animal o en un ensayo de eliminación opsonofagocítica.

Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT y las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento también se pueden usar en diversos procedimientos terapéuticos o profilácticos para la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto. En particular, los glucoconjugados enlazados a oxo-eT que comprenden un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano de una bacteria patógena, se pueden usar para prevenir, tratar o mejorar una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto causada por bacterias patógenas.

45

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la invención, en la que dicha composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano.

50

En una realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con bacterias de *S. pneumonia* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular de Pn. En algunas de tales realizaciones, la infección, la enfermedad o la afección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, meningitis, bacteriemia, septicemia, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral.

55

En otra realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con bacterias de *N. meningitidis* y el

glucoconjugado comprende un polisacárido capsular de Mn. En algunas de tales realizaciones, la infección, la enfermedad o la afección se selecciona del grupo que consiste en meningitis, meningococcemia, bacteriemia y septicemia.

5 En otra realización, la infección, la enfermedad o la afección se asocia con bacterias de *Streptococcus Grupo B* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular de GBS.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano.

10 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad o afección causada por bacterias patógenas en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad o afección causada por la infección con bacterias patógenas, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano, por ejemplo, un polisacárido capsular de Pn o Mn o GBS o de *S. aureus* o de *Enterococcus*.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la invención a un sujeto para generar una respuesta inmunitaria protectora en el sujeto, tal como se describe en detalle en el presente documento.

25 En otro aspecto más, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, por ejemplo, una infección por bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o *Streptococcus Grupo B* o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*).

30 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, para la preparación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, por ejemplo, infección por bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o *Streptococcus Grupo B* o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*).

35 En los procedimientos terapéuticos y/o profilácticos y usos descritos anteriormente, la composición inmunogénica frecuentemente comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano unido de manera covalente a una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT. En realizaciones frecuentes de los procedimientos y descritas en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular de Pn o un polisacárido capsular de Mn o un polisacárido capsular de GBS o un polisacárido capsular de *S. aureus* o un polisacárido capsular de bacterias de *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*). En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en el serotipo de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V.

En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular se selecciona, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular de *S. aureus*. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular de *S. aureus* es el polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8.

50 En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular bacteriano de *Enterococcus*. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular de bacterias de *Enterococcus* es el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

En determinadas realizaciones preferidas, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇. En realizaciones particularmente preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano de Pn o Mn o GBS o de *S. aureus* o de *Enterococcus*, conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador oxo-eT.

55

Además, la presente divulgación proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria frente a bacterias de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*) en un sujeto, procedimientos para la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección, enfermedad o afección causada por las bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o las bacterias *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*) en un sujeto, y a procedimientos para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una infección, enfermedad o afección causada por la infección por las bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*) en un sujeto, en cada caso mediante la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano derivado de las bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*), respectivamente.

Sacáridos

Los sacáridos pueden incluir polisacáridos, oligosacáridos y monosacáridos. En realizaciones frecuentes, el sacárido es un polisacárido, en particular, un polisacárido capsular bacteriano. Los polisacáridos capsulares se preparan mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

En la presente invención, los polisacáridos capsulares se pueden preparar, por ejemplo, a partir de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*. En una realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico se puede cultivar en un medio a base de soja. Los polisacáridos individuales se purifican a través de la centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía de columna. Los polisacáridos purificados se pueden activar para hacerlos capaces de reaccionar con el espaciador oxo-eT y después incorporarlos en los glucoconjugados de la invención, tal como se describe en detalle en el presente documento.

El peso molecular del polisacárido capsular es una consideración para su uso en las composiciones inmunogénicas. Los polisacáridos de alto peso molecular son capaces de inducir determinadas respuestas inmunitarias de anticuerpos debido a una valencia mayor de los epítopos presentes en la superficie del antígeno. El aislamiento y la purificación de los polisacáridos de alto peso molecular se contemplan para su uso en los conjugados, las composiciones y los procedimientos de la presente invención.

En algunas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En más de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. En algunas de tales realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F o un polisacárido capsular de los serotipos de Mn A, C, W135 o Y, o un polisacárido capsular de *Enterococcus* (tal como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*) en el que el polisacárido capsular tiene un peso molecular que está dentro de uno de los intervalos de peso molecular tal como se describe.

En algunas realizaciones, los sacáridos de la invención están O-acetilados. En algunas realizaciones, el glucoconjugado comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre el 10-100 %, entre el 20-100 %, entre el 30-100 %, entre el 40-100 %, entre el 50-100 %, entre el 60-100 %, entre el 70-100 %, entre el 75-100 %, 80-100 %, 90-100 %, 50-90 %, 60-90 %, 70-90 % u 80-90 %. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, o $\geq 90\%$, o aproximadamente el 100 %.

En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares, los glucoconjugados o las composiciones inmunogénicas de la invención se usan para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide mediante la eliminación de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de eliminación opsonofagocítica que demuestra que los anticuerpos eliminan las bacterias.

Los polisacáridos capsulares se pueden obtener directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, Fournier y col. (1984), citado anteriormente; Fournier y col. (1987) Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:561-567; Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º, 2007/0141077; y la Publicación de Solicitud de Patente de Int'l N.º WO 00/56357). Además, se pueden producir usando protocolos sintéticos. Además, el polisacárido capsular se puede producir de manera recombinante usando procedimientos de ingeniería genética también conocidos para un experto en la materia (véase, Sau y col. (1997) Microbiology 143:2395-2405; y la patente de Estados Unidos N.º 6.027.925).

Las cepas bacterianas de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o de Streptococcus grupo B o *S. aureus* o de bacterias de *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*) usadas para preparar los respectivos polisacáridos que se usan en los glucoconjugados de la invención se pueden obtener de colecciones de cultivo establecidas o de muestras clínicas.

5 **Proteínas de vehículo**

Otro componente del glucoconjugado de la invención es una proteína de vehículo con la que se conjuga el sacárido. Los términos "vehículo proteico" o "proteína de vehículo" o "vehículo" se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento. Las proteínas de vehículo preferentemente son proteínas que no son tóxicas y no son reactivas y que se pueden obtener en suficiente cantidad y pureza. Las proteínas de vehículo deberían ser modificables para los procedimientos de conjugación convencionales. En los nuevos glucoconjugados de la invención, la proteína de vehículo está unida de manera covalente al sacárido a través de un espaciador oxo-eT.

La conjugación con un vehículo puede mejorar la inmunogenicidad de un antígeno, por ejemplo, un antígeno bacteriano tal como un polisacárido capsular bacteriano. Los vehículos proteicos preferidos para los antígenos son toxinas, toxoides o cualquier material de reacción cruzada (CRM, del inglés *crossreactive material*) mutante de la toxina del tétanos, difteria, pertussis, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. En una realización, un vehículo particularmente preferido es el toxoide de difteria CRM₁₉₇, derivado de la cepa C7 (β197) de *C. diphtheriae*, que produce la proteína CRM₁₉₇. La cepa tiene un N.º de referencia de ATCC 53281. Un procedimiento para producir CRM₁₉₇ se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.614.382.

Como alternativa, se puede usar un fragmento o epítipo del vehículo proteico u otra proteína inmunogénica. Por ejemplo, se puede acoplar un antígeno hapténico a un epítipo de linfocitos T de una toxina bacteriana, toxoide o CRM. Véase, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 150.688, presentada el 1 de febrero de 1988, titulada "Synthetic Peptides Representing a T-Cell Epitope as a Carrier Molecule For Conjugate Vaccines". Otras proteínas de vehículo adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivas tales como el toxoide del cólera (por ejemplo, tal como se describe en la Solicitud de Patente de Int'l N.º WO 2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Las proteínas de la membrana externa bacteriana tales como el complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína A de la superficie neumocócica (PspA), proteína de adhesión neumocócica (PsaA) o proteína D de *Haemophilus influenzae* también se pueden usar. Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) también se pueden usar como proteínas de vehículo.

En una realización, el vehículo preferido se selecciona en el grupo que consiste en: DT (toxoides de difteria), TT (toxoides del tétanos) o fragmento C de TT, CRM₁₉₇ (una variante no tóxica pero antigénicamente idéntica de la toxina de difteria), otros mutantes de DT (tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida y col. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973), CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 o CRM107; y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones desveladas en los documentos US 4709017 o US 4950740; la mutación de al menos uno o más restos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en los documentos US 5917017 o US 6455673; o fragmento desvelado en el documento US 5843711), neumolisina neumocócica (Kuo y col. (1995) Infect Immun 63; 2706-13) que incluye ply detoxificada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, que incluye PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (las secuencias de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE se desvelan en los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299) y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones PhtDE, fusiones PhtBE, Pht A-E (documentos WO 01/98334, WO 03/54007, WO2009/000826), OMPC (proteína de membrana externa meningocócica - normalmente extraída del serogrupo B de *N. meningitidis* - EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae* - véase, por ejemplo, el documento EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos, péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668, EP0471 177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31 ; 3816-3824) tal como proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) Infect Immun 72; 4884-7) proteína de superficie neumocócica PspA (documento WO 02/091998), proteínas de absorción de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), proteínas de unión a transferrina, proteína de adhesión neumocócica (PsaA), exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (en particular, mutantes no tóxicos de los mismos (tales como exotoxina A que lleva una sustitución en el ácido glutámico 553 (Uchida Cameron DM, RJ Collier. 1987. J. Bacteriol. 169:4967-4971)). Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) también se pueden usar como proteínas de vehículo. Otras proteínas de vehículo adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivas tales como el toxoide del cólera (por ejemplo, tal como se describe en la Solicitud de Patente de Int'l N.º WO 2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.

En una realización, el vehículo se selecciona en el grupo que consiste en TT, DT, mutantes de DT (tales como CRM197), proteína D de *H. influenzae*, PhtX, PhtD, fusiones de PhtDE (en particular, las descritas en los

documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), neumolisina detoxificada, PorB, proteína N19, PspA, OMPC, toxina A o B de *C. difficile* y PsaA.

5 En una realización preferida, la proteína de vehículo de los glucoconjugados de la invención es DT (toxoides de difteria). En otra realización, la proteína de vehículo de los glucoconjugados de la invención es TT (toxoides de tétanos). En otra realización, la proteína de vehículo de los glucoconjugados de la invención es PD (proteína D de *Haemophilus influenzae* - véase, por ejemplo, el documento EP 0 594 610 B).

En una realización más preferida, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la proteína CRM₁₉₇.

10 Por consiguiente, en realizaciones frecuentes, los glucoconjugados enlazados a oxo-eT comprenden CRM₁₉₇ como la proteína de vehículo, en la que el polisacárido capsular está unido de manera covalente al espaciador oxo-eT a través de un enlace carbamato, y en la que la CRM₁₉₇ está unido de manera covalente al espaciador oxo-eT a través de un enlace amida formado por un resto de aminoácido activado de la proteína, típicamente a través de un grupo ε-amina de uno o más restos de lisina.

15 El número de restos de lisina en la proteína de vehículo que se puede llegar a conjugar con el sacárido se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones de las composiciones inmunogénicas, la CRM₁₉₇ puede comprender de 4 a 16 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que desde aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 41 % de las lisinas de CRM₁₉₇ están enlazadas covalentemente al sacárido. En otras realizaciones, la CRM₁₉₇ puede comprender de 2 a 20 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que desde aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 50 % de las lisinas de CRM₁₉₇ están enlazadas covalentemente al sacárido.

20 La frecuencia de unión de la cadena de sacáridos con una lisina en la proteína de vehículo es otro parámetro para caracterizar los glucoconjugados de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, hay al menos un enlace covalente entre la proteína de vehículo y el polisacárido por cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

25 En realizaciones frecuentes, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇ y el enlace covalente a través de un espaciador oxo-eT entre la CRM₁₉₇ y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas de tales realizaciones, el polisacárido es un polisacárido capsular bacteriano derivado de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* grupo B o un polisacárido de *S. aureus* o un polisacárido de bacterias de *Enterococcus* (tal como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*).

30 En otras realizaciones, el conjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína de vehículo y el polisacárido por cada 5 o 10 unidades de repetición; cada 2 a 7 unidades de repetición de sacáridos; cada 3 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 9 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 15 unidades de repetición de sacáridos; cada 2 a 6 unidades de repetición de sacáridos, cada 3 a 7 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 10 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 20 unidades de repetición de sacáridos; o cada 4 a 25 unidades de repetición de sacáridos.

35 En otra realización, tiene lugar al menos un enlace entre la proteína de vehículo y el sacárido por cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

Procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eT

Procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAC

40 La presente invención proporciona procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAC que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC). El espaciador oxo-eTAC, que comprende enlaces estables de carbamato, tioéter y amida, y sirve para unir de manera covalente el sacárido y la proteína de vehículo. Un extremo del espaciador oxo-eTAC está unido de manera covalente a un grupo hidroxilo del sacárido a través de un enlace carbamato. El otro extremo del espaciador oxo-eTAC está unido de manera covalente a un resto que contiene amino de la proteína de vehículo, típicamente un resto de ε-lisina, a través de un enlace amida.

45 Una ruta representativa para la preparación de glucoconjugados de la presente invención, que comprende un

polisacárido conjugado con la proteína de vehículo activa CRM₁₉₇, se muestra en la **Figura 1**.

Procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAN

5 La presente invención proporciona procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAN que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)amina (oxo-eTAAN). El espaciador oxo-eTAAN contiene enlaces estables de amina, tioéter y amida, y sirve para unir de manera covalente el sacárido y al proteína de vehículo. Un extremo del espaciador oxo-eTAAN está unido de manera covalente a un átomo de carbono del sacárido a través de un enlace amina. El otro extremo del espaciador oxo-eTAAN está unido de manera covalente a un resto que contiene amino de la proteína de vehículo, típicamente un resto de ε-lisina, a través de un enlace amida.

10 Una ruta representativa para la preparación de glucoconjugados de la presente invención, que comprende un polisacárido conjugado con la proteína de vehículo activa CRM₁₉₇, se muestra en la **Figura 2**.

Procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAD

15 La presente divulgación proporciona procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAD que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)amida (oxo-eTAAD). El espaciador oxo-eTAAD contiene enlaces estables de amida, tioéter y amida, y sirve para unir de manera covalente el sacárido y la proteína de vehículo. Un extremo del espaciador oxo-eTAAD está unido de manera covalente a un grupo carboxilo del sacárido a través de un enlace amida. El otro extremo del espaciador oxo-eTAAD está unido de manera covalente a un resto que contiene amino de la proteína de vehículo, típicamente un resto de ε-lisina, a través de un enlace amida.

20 Una ruta representativa para la preparación de glucoconjugados de la presente divulgación, que comprende un polisacárido conjugado con la proteína de vehículo activa CRM₁₉₇, se muestra en la **Figura 3**.

Procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAD a través de una ruta de activación de tiazolidinona

25 La presente divulgación proporciona procedimientos para preparar glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAD que comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)amida (oxo-eTAAD). El espaciador oxo-eTAAD contiene enlaces estables de amida, tioéter y amida, y sirve para unir de manera covalente el sacárido y la proteína de vehículo. Un extremo del espaciador oxo-eTAAD está unido de manera covalente a un grupo carboxilo del sacárido a través de un enlace amida. El otro extremo del espaciador oxo-eTAAD está unido de manera covalente a un resto que contiene amino de la proteína de vehículo, típicamente un resto de ε-lisina, a través de un enlace amida.

30 Una ruta representativa para la preparación de glucoconjugados de la presente divulgación, a través de la activación de tiazolidinona, que comprende un polisacárido conjugado con la proteína de vehículo activa CRM₁₉₇, se muestra en la **Figura 4**.

35 La estructura química de un polisacárido capsular bacteriano representativo, de los polisacáridos de serotipos neumocócicos 33F, 10A, 11A y 22F derivados de *S. pneumoniae*, que tiene posibles sitios de modificación usando el procedimiento de espaciador de oxo-eT se muestra en la **Figura 5**, **Figura 6**, **Figura 7** y **Figura 8**, respectivamente.

40 En un aspecto, el procedimiento de preparar glucoconjugado enlazado a oxo-eTAC comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un derivado de ácido carbónico, tal como 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), en un disolvente orgánico para producir un sacárido activado; b) hacer reaccionar el sacárido activado con el reactivo de enlazador heterobifuncional que tiene funciones de amina y tiol o una sal del mismo, para producir un sacárido tiolado; c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente reductor para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres; d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α-haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α-haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado; mediante el cual se produce en un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAC.

45 En una realización particularmente preferida, el procedimiento comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un polisacárido capsular Pn-33F con CDT o CDI en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de Pn-33F activado; b) hacer reaccionar el polisacárido Pn-33F activado con un reactivo de enlazador heterobifuncional que tiene funciones de amina y tiol o una sal del mismo, para producir un polisacárido Pn-33F tiolado; c) hacer reaccionar el polisacárido Pn-33F tiolado con un agente reductor para producir un polisacárido Pn-33F tiolado activado que comprende uno o más restos sulfhidrilo libres; d) hacer reaccionar el polisacárido 33F tiolado activado con una proteína de vehículo CRM₁₉₇ activada que comprende uno o más grupos α-bromoacetamida, para producir un conjugado de polisacárido Pn-33F tiolado-CRM₁₉₇; y e) hacer reaccionar el conjugado de polisacárido Pn-33F

tiolado-CRM₁₉₇ con (i) N-acetil-L-cisteína como un primer reactivo de tapado capaz de tapar grupos α -bromoacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activa; y (ii) yodoacetamida como un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del polisacárido Pn-33F tiolado activado; mediante lo cual se produce un glucoconjugado de polisacárido Pn-33F enlazado a oxo-eTAC-CRM₁₉₇.

- 5 En realizaciones frecuentes, el derivado de ácido carbónico es CDT o CDI o DSC o N-hidroxisuccinimidil cloroformato. Preferentemente, el derivado de ácido carbónico es CDT, y el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, tal como dimetilsulfóxido (DMSO). La liofilización del sacárido activado no se requiera antes de las etapas de tiolación y/o conjugación.

- 10 En una realización preferida, el sacárido tiolado se produce mediante la reacción del sacárido activado con el reactivo de tioalquilamina simétrico bifuncional, en la forma de sulfuro o una sal del mismo. Una posible ventaja para este reactivo es que el enlazador de tioalquilamina simétrico, en la forma de disulfuro, puede reaccionar con dos moléculas de sacárido activado, formando de este modo dos moléculas de sacárido tiolado por molécula de tioalquilamina tras la reducción del enlace disulfuro. Como alternativa, el sacárido tiolado se puede formar mediante la reacción del sacárido activado con tioalquilamina en la forma monomérica o una sal del mismo. Los glucoconjugados enlazados a oxo-eT producidos por los procedimientos de la invención se pueden representar por la fórmula general (I).

- En algunas realizaciones de este aspecto, la etapa d) comprende adicionalmente proporcionar una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, antes de hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con la proteína de vehículo activada, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo.
- 20 En realizaciones frecuentes, la proteína de vehículo activa comprende uno o más grupos α -bromoacetamida.

- El conjugado sacárido tiolado-proteína de vehículo se puede tratar con uno o más reactivos de tapado capaces de reaccionar con los grupos funcionales activados residuales presentes en la mezcla de reacción. Tales grupos reactivos residuales pueden estar presentes en sacáridos sin reaccionar o en componentes de proteínas de vehículo, debido a la conjugación incompleta o a partir de la presencia de un exceso de uno de los componentes en la mezcla de reacción. En ese caso, el tapado puede ayudar en la purificación o en el aislamiento del glucoconjugado. En algunos casos, los grupos funcionales activados residuales pueden estar presente en el glucoconjugado.

- Por ejemplo, el exceso de los grupos α -haloacetamida en la proteína de vehículo activada se puede tapar mediante la reacción con un tiol de bajo peso molecular, tal como N-acetil-L-cisteína, que se puede usar en exceso para asegurar el tapado completo. El tapado con N-acetil-L-cisteína también permite la confirmación de la eficacia de conjugación, mediante la detección del único aminoácido S-carboximetilcisteína (CMC) de los restos de cisteína en los sitios tapados, que se pueden determinar mediante hidrólisis ácida y análisis de aminoácidos de los productos de la conjugación. La detección de este aminoácido confirma el tapado con éxito de los grupos bromoacetamida reactivos, haciéndolos, por lo tanto, incapaces de reaccionar químicamente de forma indeseable. Los niveles aceptables de covalencia y de tapado están entre aproximadamente 1-15 para CMCA/lys y aproximadamente 0-5 para CMC/lys. De forma similar, los restos de sulfhidrilo libre en exceso se pueden tapar mediante reacción con un agente electrófilo de bajo peso molecular, tal como yodoacetamida. Una parte del CMCA puede derivar de los tioles de polisacárido tapados directamente mediante yodoacetamida que no estuvieron implicados en la conjugación con los grupos haloacilo de la proteína de vehículo. Por lo tanto, se necesita examinar las muestras de reacción de la postconjugación (antes del tapado mediante yodoacetamida) mediante análisis de aminoácidos (CMCA) para determinar los niveles precisos de tioles implicados directamente en la conjugación. Para un sacárido tiolado que contiene 10-12 tioles, típicamente se determina que 5-6 tioles están implicados directamente en la conjugación entre el tiol del polisacárido y la proteína bromoacetilada y 4-5 tioles se tapan mediante yodoacetamida.

- En realizaciones preferidas, el primer reactivo de tapado es N-acetil-L-cisteína, que reacciona con los grupos α -haloacetamida no conjugados en la proteína de vehículo. En otras realizaciones, el segundo reactivo de tapado es yodoacetamida (IAA), que reacciona con los grupos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado. Con frecuencia, la etapa e) comprende el tapado con N-acetil-L-cisteína como el primer reactivo de tapado e IAA como el segundo reactivo de tapado. En algunas realizaciones, la etapa de tapado e) comprende adicionalmente la reacción con un agente de reducción, por ejemplo, DTT, TCEP o mercaptoetanol, tras la reacción con el primer y/o el segundo reactivo de tapado.

- En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de purificación del glucoconjugado enlazado a oxo-eT, por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración.

- En una realización preferida, el reactivo de tioalquilamina simétrico bifuncional es cistamina o una sal del mismo y reacciona con el sacárido activado para proporcionar un sacárido tiolado o una sal del mismo que contiene un resto disulfuro.

La reacción de tales derivados de sacáridos tiolados con un agente reductor produce un polisacárido tiolado activado que comprende uno o más restos sulfhidrilo libres (si el tiol está protegido). Tales sacáridos tiolados activados se pueden aislar y purificar, por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración. Como alternativa, los sacáridos tiolados

activados se pueden aislar y purificar, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) o procedimientos de cromatografía de intercambio iónico tales como DEAE conocido en la materia.

5 En el caso de sacáridos tiolados derivados de cistamina, la reacción con un agente reductor escinde el enlace disulfuro para proporcionar un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos sulfhidrilo libres. En el caso de los sacáridos tiolados derivados de cisteamina, la reacción con un agente reductor es opcional y se puede usar para reducir enlaces disulfuro formados mediante la oxidación del reactivo o del producto.

10 Los agentes reductores usados en los procedimientos de la invención incluyen, por ejemplo, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT) o mercaptoetanol. Sin embargo, se puede usar cualquier agente reductor de disulfuro adecuado.

En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden adicionalmente proporcionar una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, preferentemente, uno o más grupos α -bromoacetamida.

15 La reacción del sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más de los restos de α -haloacetamida da como resultado un desplazamiento nucleofílico del grupo α -halo de la proteína de vehículo activada mediante el uno o más grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activado, formando el enlace tioéter del espaciador oxo-eT.

20 Los restos de aminoácidos α -haloacetilados de la proteína de vehículo normalmente están unidos a los grupos ϵ -amino del uno o más restos de lisina de la proteína de vehículo. En realizaciones frecuentes, la proteína de vehículo contiene uno o más restos de aminoácidos α -bromoacetilados. En una realización, la proteína de vehículo se activa con un reactivo de ácido bromoacético, tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (BAANS).

25 En una realización, el procedimiento incluye la etapa de proporcionar una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida y hacer reaccionar el polisacárido tiolado activado con la proteína de vehículo activada para producir un conjugado polisacárido tiolado-proteína de vehículo, mediante el cual se produce un glucoconjugado que comprende un polisacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT.

30 En algunas realizaciones preferidas de los procedimientos en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular Pn derivado de *S. pneumoniae*. En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular de Pn se selecciona del grupo que consiste en el serotipo de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En determinadas realizaciones preferidas, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇ y el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

35 En otras realizaciones preferidas de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular Mn derivado de *N. meningitidis*. En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular de Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y. En determinadas realizaciones preferidas, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇ y el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y.

40 En otras realizaciones preferidas de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular de GBS derivado de *Streptococcus* Grupo B. En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular de GBS se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V. En determinadas realizaciones preferidas, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇ y el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V.

45 En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el sacárido se combinó con imidazol o triazol y después se hizo reaccionar con un derivado de ácido carbónico, tal como CDT, en un disolvente orgánico (por ejemplo, DMSO) que contiene aproximadamente el 0,2 % en p/v de agua para producir sacáridos activados. El uso del sacárido compuesto en la etapa de activación aumenta la solubilidad del sacárido en el disolvente orgánico. Normalmente, el sacárido se combinó con 10 gramos de excipiente de 1,2,4-triazol por gramo de polisacárido seguido de la mezcla a temperatura ambiente para proporcionar un sacárido compuesto.

55 Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los procedimientos comprenden adicionalmente una etapa de combinar el sacárido con triazol o imidazol para dar un sacárido compuesto antes de la etapa de activación a). En algunas de tales realizaciones, el sacárido compuesto se congela en el recipiente, se liofiliza y se reconstituye en un disolvente orgánico (tal como DMSO) y se añade aproximadamente el 0,2 % en p/v de agua antes de la activación con el derivado de ácido carbónico, por ejemplo, CDT.

- En una realización, la mezcla de reacción de sacárido tiolado se trata opcionalmente con éster metílico de N-acetil-lisina para tapar cualquier sacárido activado que no ha reaccionado. En algunas de tales realizaciones, la mezcla de sacárido tiolada tapada se purifica mediante ultrafiltración/diafiltración.
- 5 En realizaciones frecuentes, el sacárido tiolado se hace reaccionar con un agente reductor para producir un sacárido tiolado activado. En algunas de tales realizaciones, el agente reductor es tris(-2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT) o mercaptoetanol. En algunas de tales realizaciones, el sacárido tiolado activado se purifica mediante ultrafiltración/diafiltración.
- 10 En una realización, el procedimiento de producción de un glucoconjugado enlazado con oxo-eT comprende la etapa de ajustar y mantener el pH de la mezcla de reacción de sacárido tiolado activado y proteína de vehículo a un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 5 °C.
- En una realización, el procedimiento de producir un glucoconjugado de la invención comprende la etapa de aislar el conjugado sacárido tiolado-proteína de vehículo después de que se produce. En realizaciones frecuentes, el glucoconjugado se aísla mediante ultrafiltración/diafiltración.
- 15 En otra realización, el procedimiento de producir un glucoconjugado enlazado a oxo-eT de la invención comprende la etapa de aislar el conjugado de sacárido aislado-proteína de vehículo después de que se produce. En realizaciones frecuentes, el glucoconjugado se aísla mediante ultrafiltración/diafiltración.
- En otra realización más, el procedimiento de producir el sacárido activado comprende la etapa de ajustar la concentración de agua de la mezcla de reacción que comprende el sacárido y CDT en un disolvente orgánico hasta entre aproximadamente 0,1 y 0,4 %. En una realización, la concentración de agua de la mezcla de reacción que
- 20 comprende sacárido y CDT en un disolvente orgánico se ajusta a aproximadamente el 0,2 %.
- En una realización, la etapa de activar el sacárido comprende hacer reaccionar el polisacárido con una cantidad de CDT que está en un exceso aproximado de 5 molar con la cantidad de polisacárido presente en la mezcla de reacción que comprende el polisacárido capsular y CDT en un disolvente orgánico.
- 25 En otra realización, el procedimiento de producir el glucoconjugado de la invención comprende la etapa de determinar la concentración de agua de la mezcla de reacción que comprende el sacárido. En una de tales realizaciones, la cantidad de CDT añadida a la mezcla de reacción para activar el sacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que es equimolar a la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende el sacárido y CDT en un disolvente orgánico.
- 30 En otra realización, la cantidad de CDT añadida a la mezcla de reacción para activar el sacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que está en una proporción molar de aproximadamente 0,5:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende el sacárido y CDT en un disolvente orgánico. En una realización, la cantidad de CDT añadida a la mezcla de reacción para activar el sacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que está en una proporción molar de 0,75:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende el sacárido y CDT en un
- 35 disolvente orgánico.
- En una realización, el procedimiento comprende la etapa de aislar el polisacárido tiolado mediante diafiltración. En otra realización, el procedimiento comprende la etapa de aislar el polisacárido tiolado activado mediante diafiltración.
- En una realización, la proteína de vehículo usada en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de Pn aislado-proteínas de vehículo comprende CRM₁₉₇. En otra realización, la proteína de
- 40 vehículo usada en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de Mn aislado-proteínas de vehículo comprende CRM₁₉₇.
- En algunas realizaciones, la proporción de sacárido : proteína de vehículo activada (p/p) está entre 0,2 y 4. En otras realizaciones, la proporción de sacárido : proteína de vehículo activada (p/p) está entre 1,0 y 2,5. En realizaciones adicionales, la proporción de sacárido : proteína de vehículo activada (p/p) está entre 0,4 y 1,7. En otras
- 45 realizaciones, la proporción de sacárido : proteína de vehículo activada (p/p) es aproximadamente 1 : 1. En algunas de tales realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano y la proteína de vehículo activada se genera mediante la activación (bromoacetilación) de CRM₁₉₇.
- En otra realización, el procedimiento de producción del sacárido activado comprende el uso de un disolvente orgánico. En realizaciones frecuentes, el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar. En algunas de tales
- 50 realizaciones, el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona (NMP), acetonitrilo, 1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU) y hexametilfosforamida (HMPA) o una mezcla de los mismos. En una realización preferida, el disolvente orgánico es DMSO.
- 55 En realizaciones frecuentes, el aislamiento del glucoconjugado enlazado a oxo-eT comprende una etapa de ultrafiltración/diafiltración.

En una realización, el sacárido usado en el procedimiento de producción del glucoconjugado de la invención tiene un peso molecular de entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 2.000 kDa. En otra realización, el sacárido usado en el procedimiento de producción del glucoconjugado de la invención tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 2.000 kDa.

- 5 En una realización, el glucoconjugado producido en el procedimiento de producción del glucoconjugado polisacárido capsular-proteína de vehículo tiene un tamaño de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 20.000 kDa. En otra realización, el glucoconjugado producido en el procedimiento de producción del glucoconjugado polisacárido capsular-proteína de vehículo tiene un tamaño de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 10.000 kDa. En una realización, el glucoconjugado producido en el procedimiento de producción del glucoconjugado polisacárido capsular-proteína de vehículo tiene un tamaño de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 3.000 kDa.

En otro aspecto, la invención proporciona un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT, producido mediante cualquiera de los procedimientos desvelados en el presente documento.

- 15 En otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

El grado de O-acetilación del sacárido se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la materia, por ejemplo, mediante RMN de protones (Lemercinier y Jones (1996) Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones y Lemercinier (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30; 1233-1247, el documento WO 05/033148 o WO 00/56357). Otro procedimiento usado comúnmente se describe por Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261. Otro procedimiento más se basa en la cromatografía por exclusión de iones HPLC. El grado de O-acetilación se determina mediante la evaluación de la cantidad de acetato libre presente en una muestra y comparando ese valor con la cantidad de acetato liberado tras una hidrólisis básica suave. El acetato se redisuelve de otros componentes de la muestra y se cuantifica con una detección ultravioleta (UV) a 210 nm. Otro procedimiento se basa en la cromatografía por exclusión de iones HPLC. El O-acetilo se determina mediante la evaluación de la cantidad de acetato libre presente en una muestra y comparando ese valor con la cantidad de acetato liberado tras una hidrólisis básica suave. El acetato se redisuelve de otros componentes de la muestra y se cuantifica con una detección ultravioleta (UV) a 210 nm.

Grado de conjugación determinado por análisis de aminoácidos

30 La hidrólisis ácida de las muestras de conjugado "tapadas con pre-IAA" generadas usando la química de la activación con bromoacetilo dio como resultado la formación de carboximetiltoalquilamina (CMTA) estable en ácido de los sitios conjugados y de S-carboximetilcisteína (CMC) de las cisteínas en los sitios tapados. La hidrólisis ácida de las muestras de conjugados "tapadas con post-IAA" (final) generadas usando la química de la activación con bromoacetilo también dio como resultado la formación de (CMTA) estable en ácido de los sitios conjugados y los sitios tapados con IAA de S-carboximetilcisteína (CMC) de las cisteínas en los sitios tapados. Todas las lisinas no conjugadas y no tapadas se convirtieron de nuevo a lisina y se detectaron como tal. Todos los otros aminoácidos se hidrolizaron de nuevo a aminoácidos libres excepto el triptófano y la cisteína, que se eliminaron por las condiciones de la hidrólisis. La asparagina y la glutamina se convirtieron a ácido aspártico y a ácido glutámico, respectivamente.

40 Los aminoácidos de cada muestra hidrolizada y del control se separaron usando cromatografía de intercambio iónico seguida por la reacción con solución Beckman Ninhydrin NinRX a 135 °C. Los aminoácidos derivatizados se detectaron después en el rango visible a 570 nm y a 440 nm (véase la Tabla 1). Un conjunto estándar de aminoácidos [Pierce Amino Acid Standard H] que contiene 500 picomoles de cada aminoácido se dejó correr junto con las muestras y los controles para cada conjunto de análisis. Se añadió S-carboximetilcisteína [Sigma-Aldrich] al estándar.

Tabla 1

Tiempos de retención para los aminoácidos			
usando el programa de gradiente 1 en el analizador de aminoácidos Beckman 6300			
TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	AMINOÁCIDO	LONGITUD DE ONDA USADA PARA LA DETECCIÓN	
8,3	Carboximetilcisteína	CMC	570
9,6	Ácido aspártico y asparagina	Asx	570
11,3	Treonina	Thr	570
12,2	Serina	Ser	570
15,8	Ácido glutámico y glutamina	Glx	570 y 440
18,5	Prolina	Pro	440
21,8	Glicina	Gly	570

(continuación)

Tiempos de retención para los aminoácidos			
usando el programa de gradiente 1 en el analizador de aminoácidos Beckman 6300			
TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	AMINOÁCIDO		LONGITUD DE ONDA USADA PARA LA DETECCIÓN
23,3	Alanina	Ala	570
29,0	Valina	Val	570
32,8	Metionina	Met	570
35,5	Isoleucina	Ile	570
36,8	Leucina	Leu	570
40,5	Tirosina	Tyr	570
42,3	Fenilalanina	Phe	570
45,4	Carboximetilcisteamina	CMCA	570
48,8	Histidina	His	570
53,6	Lisina	Lys	570
70,8	Arginina	Arg	570

Se eligió lisina para la evaluación basándose en su unión covalente a cisteína y a cisteamina y en la hidrólisis similar esperada. Los números resultantes de moles de aminoácidos se compararon después con la composición de aminoácidos de la proteína y se documentaron junto con los valores para CMC, CMTA o CMCA (en el caso del enlazador de cisteamina). El valor de pre-IAA-CMTA se usó directamente para la evaluación del grado de conjugación, el valor de CMC se usó directamente para la evaluación del grado del primer tapado y el valor de post-IAA-CMTA se usó para la evaluación del grado del (segundo) tapado con IAA.

En una realización, el glucoconjugado se caracteriza por su distribución del tamaño molecular (K_d). El tamaño molecular de los conjugados se determina con medio de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) con fase estacionaria de Sefarosa CL-4B usando el sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para la determinación de la K_d , primero se calibra la cromatografía para determinar el V_0 , que representa el volumen de vacío o el volumen de exclusión total, y V_i , el volumen al que las moléculas más pequeñas en la muestra eluyen, también conocido como volumen interpartícula. Toda la separación de la SEC tiene lugar entre el V_0 y el V_i . El valor de K_d para cada parte recogida se determina mediante la siguiente expresión $K_d = (V_e - V_i) / (V_i - V_0)$, en la que V_e representa el volumen de retención del compuesto. El % de fracción (pico principal) que eluye a $\leq 0,3$ define la K_d del conjugado (distribución del tamaño molecular).

Composiciones inmunogénicas

El término "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno (por ejemplo, un microorganismo o un componente del mismo) que se puede usar para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Tal como se utiliza en el presente documento, "inmunogénica" significa una capacidad de un antígeno (o un epítipo del antígeno), tal como un polisacárido capsular bacteriano, o un glucoconjugado o una composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular bacteriano, para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto hospedador, tal como un mamífero, bien humoral o celular o ambas.

El glucoconjugado puede servir para sensibilizar al hospedador mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas del MHC en una superficie celular. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígeno o anticuerpos para permitir la futura protección de un hospedador inmunizado. Los glucoconjugados, por lo tanto, pueden proteger al hospedador de uno o más síntomas asociados con la infección por las bacterias, o puede proteger al hospedador de la muerte debido a la infección con las bacterias asociadas con el polisacárido capsular. Los glucoconjugados también se pueden usar para generar anticuerpos policlonales o monoclonales, que se pueden usar para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. Los glucoconjugados también se pueden usar para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide mediante la eliminación de bacterias en un modelo de eficacia animal o a través de un ensayo de eliminación opsonofagocítica.

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de manera específica a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en el presente documento, salvo que se indique otra cosa por el contexto, el término pretende abarcar no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos diseñados genéticamente (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivatizados para alterar las funciones efectoras, la estabilidad y otras actividades biológicas) y los fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) y anticuerpos

de dominio, incluyendo anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos tal como se describe en el presente documento, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclases de los mismos), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar inmunoglobulinas a las diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en seres humanos. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponde con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de la subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

"Fragmentos de anticuerpo" comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, en la que la porción preferentemente conserva al menos una, preferentemente la mayoría o todas, las funciones que normalmente se asocian con esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto.

El término "antígeno" generalmente se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido o conjugado en una composición inmunogénica o una sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o de respuestas de linfocitos T, o ambas, en un sujeto, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en el sujeto. La respuesta inmunitaria se puede generar para la molécula completa o para diversas porciones de la molécula (por ejemplo, un epítipo o hapteno). El término se puede usar para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno es reconocido por los anticuerpos, los receptores de los linfocitos T u otros elementos de inmunidad humoral y/o celular específica. "Antígeno" también incluye todos los epítipos antigénicos relacionados. Los epítipos de un antígeno dado se pueden identificar usando cualquiera de las técnicas de mapeo de epítipos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J. Por ejemplo, los epítipos lineales se pueden determinar mediante, por ejemplo, la síntesis de manera concurrente de grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos con porciones de la molécula proteica, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos aún están unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la materia y se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De forma similar, los epítipos conformacionales se pueden identificar mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, citado anteriormente. Además, a efectos de la presente invención, "antígeno" también se puede usar para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza, pero pueden ser no conservativas), a la secuencia natural, siempre que la proteína conserve la capacidad para generar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis de sitio dirigido, o mediante procedimientos de síntesis particulares, o mediante una estrategia de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de los hospedadores, que producen los antígenos. Además, el antígeno puede ser derivado, obtenido o aislado de un microbio, por ejemplo, una bacteria o puede ser un organismo completo. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también se incluye en la definición. También se incluyen antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepitopos, epítipos flanqueantes, y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente (Bergmann y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann y col. (1996) J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier (1997) Immunol. Cell Biol. 75:402-408; Gardner y col. (1998) 12ª Conferencia Mundial del SIDA, Ginebra, Suiza, del 28 de junio al 3 de julio de 1998).

Una respuesta inmunitaria "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para generar una respuesta inmunitaria, bien humoral o celular o ambas, que sirve para proteger a un sujeto frente a una infección. La protección proporcionada no necesita ser absoluta, es decir, no se necesita que la infección se prevenga o erradique por completo, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control de los sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se les administra la vacuna o la composición inmunogénica. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o la rapidez de la aparición de síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunitaria protectora" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluyendo algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En situaciones particulares, una "respuesta inmunitaria protectora" podría incluir la inducción de un aumento de dos veces de los niveles de anticuerpos o u aumento de cuatro veces de los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluyendo algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes se correlacionan con una respuesta inmunitaria protectora. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria protectora se puede ensayar midiendo el porcentaje de reducción en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo, los descritos a continuación. Preferentemente, hay una reducción en el recuento de bacterias de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más.

Las expresiones "una cantidad eficaz", y "una cantidad inmunológicamente eficaz", que se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a la cantidad de antígeno o de composición inmunogénica suficiente como para generar una respuesta inmunitaria, que puede ser una respuesta celular (linfocitos T) o humoral (linfocitos B o anticuerpos), o ambas, en la que tal respuesta inmunitaria se puede medir mediante ensayos convencionales conocidos por un experto en la materia. Normalmente, una cantidad inmunológicamente eficaz generará una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar de manera profiláctica o terapéutica a un sujeto susceptible a la infección bacteriana, por ejemplo, por bacterias *S. pneumonia* o *N. meningitidis* o *Streptococcus* Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*), por medio de la administración de composiciones inmunogénicas a través de una vía sistémica, dérmica o mucosal, o se pueden usar para generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales que se podría usar para conferir inmunidad pasiva a otro sujeto. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de la administración mucosal a los tractos oral/alimentario, respiratorio y urogenital. Las composiciones inmunogénicas también se pueden usar para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide mediante la eliminación de bacterias en un modelo de eficacia animal o a través de un ensayo de eliminación opsonofagocítica.

Las cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas de forma adecuada.

En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica comprenderá uno o más adyuvantes. Tal como se define en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para mejorar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de la presente invención. Por lo tanto, los adyuvantes a menudo se dan para reforzar la respuesta inmunitaria y son bien conocidos por el experto en la materia. Los adyuvantes adecuados para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación:

(1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.;

(2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (definidos a continuación) o componentes de pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo,

(a) MF59 (Publ. de PCT N.º WO 90/14837), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación, aunque no se requiere)) formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, Mass.),

(b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero LI21 bloqueado con plurónico al 5 %, y thr-MDP (véase a continuación) bien microfluidizada en una emulsión submicrométrica o agitada vorticialmente para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y

(c) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, Mont.) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A 3-O-deacilado (MPL™) descrito en la Patente de EE.UU. N.º 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura de pared celular (CWS), preferentemente MPL+CWS (Detox™);

(3) adyuvantes de saponina, tales como Quil A o STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, Mass.) (Pat. de EE.UU. N.º 5.057.540) se pueden usar o partículas generadas a partir de los mismos tales como los ISCOM (complejos inmunoestimulantes);

(4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos sintéticos del lípido A tales como compuestos de aminoalquil glucosamina fosfato (AGP) o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles de Corixa, y que se describen en la Pat. de EE.UU. N.º 6.113.918; uno de tales AGP es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (comúnmente conocido como RC529) que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen motivo(s) de CpG (Pat. de EE.UU. N.º 6.207.646);

(5) citocinas, tales como las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, etc.;

(6) mutantes detoxificados de una toxina ADP-ribosilante bacteriana tal como una toxina del cólera (CT) Bien en forma silvestre o en forma mutante, por ejemplo, en la que el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 se

reemplaza mediante otro aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la solicitud de patente internacional publicada número WO 00/18434 (véase también los documentos WO 02/098368 y WO 02/098369), una toxina de pertussis (PT) o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), en particular, LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (véase, por ejemplo, los documentos WO 93/13302 y WO 92/19265); y

- 5 (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición.

Los péptidos de muramilo incluyen, pero sin limitación, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilnormuramil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

- 10 En determinadas realizaciones, el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio, tal como una sal de aluminio. En realizaciones específicas, el adyuvante a base de aluminio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización específica, el adyuvante es fosfato de aluminio.

- 15 La composición inmunogénica opcionalmente puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos aprobados por una agencia reguladora de un Federal, un gobierno estatal u otra agencia reguladora, o que figuran en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en sujetos, incluyendo seres humanos así como mamíferos no humanos. El término vehículo se puede usar para referirse a un diluyente, excipiente o portador con el que se administra la composición farmacéutica. El agua, las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y de glicerol se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

- 20 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más conservantes además de multitud de conjugados de polisacárido capsular-proteína. La FDA requiere que los productos biológicos en frascos de múltiples dosis (multidosis) contengan un conservante, con solo unas pocas excepciones. Los productos de vacuna que contienen conservantes incluyen vacunas que contienen cloruro de bencetonio (carbunco), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabies). Los conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato fenilmercúrico.

- 30 En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos no iónicos, incluyendo pero sin limitación, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, Polisorbato-80 (Tween 80), Polisorbato-60 (Tween 60), Polisorbato-40 (Tween 40) y Polisorbato-20 (Tween 20), polioxietilenaquíleres, incluyendo, pero sin limitación Brij 58, Brij 35, así como otros tales como Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 y la serie de tensioactivos no iónicos de Plurónico (por ejemplo, Plurónico 121), con los componentes preferidos de Polisorbato-80 a una concentración de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 2 % (prefiriendo hasta aproximadamente el 0,25 %) o Polisorbato-40 a una concentración de aproximadamente el 0,001 % al 1 % (prefiriendo hasta aproximadamente el 0,5 %).

Envasado y formas de dosificación

- 40 La administración directa de las composiciones inmunogénicas de la presente invención a un sujeto se puede llevar a cabo mediante administración parenteral (por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa o al espacio intersticial de un tejido); o a través de la administración mucosal a los tractos oral/alimentario, respiratorio y urogenital; o mediante administración tópica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra administración mucosal.

- 45 En una realización, la administración parenteral es mediante inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o en el brazo del sujeto. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también se puede usar como alternativa la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. En otra realización, se usa la administración intranasal para el tratamiento de neumonía u otitis media (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos se puede prevenir de manera más eficaz, atenuando de este modo la infección en su etapa más temprana).

- 50 Las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas formas, por ejemplo, para inyección bien como soluciones líquidas o suspensiones. En determinadas realizaciones, la composición se puede preparar como un polvo o un pulverizador para la administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición se puede preparar como un supositorio o como un pesario, o para la administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo, como un pulverizador, pastillas, gel o polvos.

La cantidad de glucoconjugado en cada dosis de composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Tal cantidad puede variar en función del serotipo bacteriano presente en el glucoconjugado.

En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, en particular, de 0,1 a 10 µg y más en particular, de 1 a 5 µg.

5 En una realización particular de la presente invención, la composición inmunogénica es una formulación de líquido estéril de un polisacárido capsular de Pn o de Mn conjugado de forma individual con CRM₁₉₇ a través de un enlazador oxo-eT, en el que cada dosis de 0,5 ml se formula para que contenga 1-5 µg de polisacárido, que puede contener adicionalmente un adyuvante de 0,125 mg de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

10 Las cantidades óptimas de los componentes para una composición inmunogénica particular se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de las respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas de forma adecuada.

15 Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden envasar en forma de dosis única o de multidosis (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis o más). Para formas multidosis, normalmente, aunque no necesariamente, se prefieren los frascos frente a las jeringas precargadas. Los formatos multidosis adecuados incluyen pero no se limitan a: 2 a 10 dosis por envase a 0,1 a 2 ml por dosis. En determinadas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional WO 2007/127668.

20 Las composiciones se pueden presentar en frascos u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o se pueden presentar en dispositivos de administración precargados, por ejemplo, jeringas de componente único o múltiple, que se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa normalmente, aunque no necesariamente, contiene una dosis única de la composición inmunogénica de la invención que contiene conservante, aunque también se contemplan jeringas precargadas de multidosis. Asimismo, un frasco puede incluir una dosis única pero, como alternativa, puede incluir múltiples dosis.

25 Los volúmenes de dosificación eficaces se pueden establecer de forma habitual, pero una dosis típica de la composición para la inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En determinadas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano. En determinadas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano adulto, a un joven, a un adolescente, a un niño que está aprendiendo a andar o a un lactante (es decir, de no más de un año de edad) y, en realizaciones preferidas, se puede administrar mediante inyección.

30 Las composiciones inmunogénicas líquidas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando se va a usar una composición inmunogénica para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más frascos, dos o más jeringas ya cargadas, o uno o más de cada uno, usando los contenidos de la jeringa para reconstituir los contenidos del frasco antes de la inyección o viceversa.

35 En otra realización más, un recipiente de formato multidosis se selecciona de uno o más de los grupos que consisten en, pero sin limitación, instrumental de vidrio de laboratorio general, matraces, vasos de precipitados, probetas graduadas, fermentadores, biorreactores, tubos, tubos de ensayo, bolsas, jarros, frascos, cierres de frascos (por ejemplo, un tapón de caucho, una tapa de rosca), ampollas, jeringas, jeringas dobles o multicámara, tapones de jeringa, émbolos de jeringa, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y bolígrafos desechables y similares. El recipiente de la presente invención no se limita por el material de fabricación, e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, termoplásticos-elastómeros). En una realización particular, el recipiente del formato es un frasco de vidrio Schott Type 1 de 5 ml con un tapón de butilo. El experto en la materia apreciará que el formato establecido anteriormente no es de ninguna manera una lista exhaustiva, pero meramente sirve como una directriz para el experto en la materia con respecto a la variedad de formatos disponibles para la presente invención. Los formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención se pueden encontrar en los catálogos publicados de los proveedores y fabricantes de equipos de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria y protección frente a la infección

40 La presente divulgación también incluye procedimientos para usar glucoconjugados enlazados a oxo-eT y composiciones inmunogénicas que los comprenden, bien de manera profiláctica o de manera terapéutica. Por ejemplo, un aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria frente a bacterias patógenas, por ejemplo, bacterias neumocócicas o meningocócicas, que comprende administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento que comprenden un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano que deriva de bacterias patógenas. Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento de protección de un sujeto frente a una infección mediante bacterias patógenas o un procedimiento de prevención, tratamiento o mejora de una infección, enfermedad o afección asociada con una bacteria patógena, o un procedimiento de reducción de la gravedad de o de retraso en la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección provocada por bacterias patógenas, comprendiendo los procedimientos en cada caso administrar a un sujeto una cantidad

inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento que comprenden un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano derivado de las bacterias patógenas.

5 Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la invención, en la que dicha composición inmunogénica comprende un glucoconjugado enlazado a oxo-eT que comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano.

10 En algunas realizaciones, el procedimiento de la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección comprende el tratamiento humano, veterinario, animal o agrícola. Otra realización proporciona un procedimiento de la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección asociada con bacterias patógenas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpo policlonal o monoclonal de la composición inmunogénica descrita en el presente documento, y el uso de dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento de prevención de una infección bacteriana en un sujeto que se está sometiendo a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una cantidad profilácticamente eficaz de una composición inmunogénica descrita en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

20 En realizaciones preferidas de cada uno de los procedimientos anteriores, las bacterias patógenas son bacterias neumocócicas o meningocócicas, tales como las bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitis*. En algunas de tales realizaciones, el antígeno bacteriano es un polisacárido capsular seleccionado del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otras de estas realizaciones, el antígeno bacteriano es un polisacárido capsular seleccionado del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y. En otras de estas realizaciones, el antígeno bacteriano es un polisacárido capsular seleccionado del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, el polisacárido capsular de *S. aureus* serotipo 5 u 8) o un polisacárido capsular de bacterias de *Enterococcus* (tales como los polisacáridos capsulares de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*).

30 Una respuesta inmunitaria para un antígeno o composición inmunogénica se caracteriza por el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular frente a moléculas presentes en el antígeno o en la composición inmunogénica de interés. Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" es una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos, e implica la inducción y la generación de anticuerpos que reconocen y se unen con alguna afinidad por el antígeno en la composición inmunogénica de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" se genera mediante la presentación de los epítomos del antígeno en asociación con las moléculas de Clase I o de Clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), CD1 u otras moléculas no clásicas de tipo MHC. Esto activa los linfocitos T CD4+ colaboradores específicos de antígeno y linfocitos T CD8+ citotóxicos ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por los MHC clásicos o no clásicos y se expresan en las superficies de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por los linfocitos T colaboradores. Los linfocitos T colaboradores actúan para ayudar a estimular la función, y centran la actividad de, células efectoras inespecíficas frente a células que presentan el péptido u otros antígenos en asociación con las moléculas clásicas o no clásicas del MHC sobre su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas similares producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluyendo aquellas que derivan de los linfocitos T CD4+ y CD8+. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células se puede determinar mediante una serie de análisis, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de linfocitos citotóxicos CTL, evaluando respecto de linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado o midiendo la producción de citocinas por parte de linfocitos T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col. (1993) J. Immunol. 151:4189-4199; y Doe y col. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376.

55 Las composiciones inmunogénicas y los procedimientos de la invención pueden ser útiles para uno o más de los siguientes: (i) la prevención de infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la gravedad de, o, en la eliminación de síntomas y/o (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o del trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento se puede efectuar de manera profiláctica (antes de la infección) o de manera terapéutica (tras la infección). En la presente divulgación, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con una realización particular de la presente divulgación, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo la inmunización de forma profiláctica y/o terapéutica, un sujeto hospedador frente a la infección bacteriana, por ejemplo, por *S. pneumoniae* o *N. meningitidis*, GBS o *S. aureus* o bacterias de *Enterococcus* (tales como *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*). Los procedimientos de la presente

divulgación son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los procedimientos de la presente divulgación también se pueden realizar en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un ser humano o a un animal no humano. Más particularmente, sujeto se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de investigación, de zoo, de competición y de compañía tales como mascotas domésticas y otros animales domesticados que incluyen, pero sin limitación, vacas, ovejas, hurones, cerdos, caballos, conejos, cabras, perros, gatos y similares. Los animales de compañía preferidos son los perros y los gatos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

La cantidad de un conjugado particular en una composición generalmente se calcula basándose en la cantidad total del polisacárido, tanto conjugado como no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un polisacárido con el 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 µg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 µg de polisacárido no conjugado en una dosis de polisacárido de 100 µg. La contribución de proteína al conjugado normalmente no se considera cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad inmunogénica de un conjugado o una composición inmunogénica puede variar en función del serotipo bacteriano. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, en particular, de 0,1 a 10 µg y más en particular, de 1 a 10 µg. La cantidad inmunogénica de los diferentes componentes del polisacárido en una composición inmunogénica puede variar y cada uno puede comprender 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg o aproximadamente 100 µg de cualquier antígeno de polisacárido particular.

La expresión "enfermedad invasiva" se refiere al aislamiento de bacterias de un sitio normalmente estéril, en el que hay signos/síntomas clínicos de enfermedad asociados. Los sitios corporales normalmente estériles incluyen la sangre, LCR, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido articular/sinovial, hueso, sitios corporales internos (nódulos linfáticos, cerebro, corazón, hígado, bazo, humor vítreo, riñón, páncreas, ovario) u otros sitios normalmente estériles. Las afecciones clínicas que caracterizan las enfermedades invasivas incluyen bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, choque séptico y más.

La eficacia de un antígeno como un inmunógeno se puede medir bien mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citotóxicos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de un linfocito T para lisar su célula diana específica, o midiendo los niveles de actividad de linfocitos B midiendo los niveles de anticuerpos en circulación específicos para el antígeno en el suero. También se puede detectar una respuesta inmunitaria midiendo los niveles séricos de anticuerpos específicos de antígeno inducidos tras la administración del antígeno, y más específicamente, midiendo la capacidad de los anticuerpos inducidos de este modo para mejorar la capacidad opsonofagocítica de determinados glóbulos blancos, tal como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria se puede medir exponiendo al hospedador inmunizado con el antígeno que se ha administrado. Por ejemplo, si el antígeno para el que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección inducido por la cantidad inmunogénica del antígeno se mide mediante la detección del porcentaje de supervivencia o del porcentaje de mortalidad tras la exposición de los animales con las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección se puede medir midiendo al menos un síntoma asociado con la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada con la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna multiantígeno o multicomponente o las composiciones inmunogénicas variarán con respecto a cada uno de los otros componentes y se puede determinar mediante los procedimientos conocidos por el experto en la materia. Tales procedimientos incluirían procedimientos para medir la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen de manera específica y de manera selectiva a los polisacáridos capsulares o glucoconjugados de la presente invención. En algunas de tales realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen de manera específica y de manera selectiva a los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F o a los glucoconjugados que los comprenden. En otras de estas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen de manera específica y de manera selectiva a los polisacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 o Y o a los glucoconjugados que los comprenden. En otras de estas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen de manera específica y de manera selectiva a los polisacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V o a los glucoconjugados que los comprenden. En otras de estas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen de manera específica y de manera selectiva al polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8 o a los polisacáridos capsulares de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium* o a los glucoconjugados que los comprenden. En algunas realizaciones, los anticuerpos se generan tras la administración a un sujeto de los polisacáridos capsulares o de los glucoconjugados de la presente invención. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos purificados o aislados dirigidos frente a uno o más de los polisacáridos capsulares o glucoconjugados de la presente invención. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación son funcionales tal como se mide mediante la eliminación de bacterias en un modelo de eficacia animal o a través de un ensayo de eliminación opsonofagocítica. Los anticuerpos o las composiciones de anticuerpos de la divulgación se pueden usar en un procedimiento de tratamiento o de prevención de una infección bacteriana, enfermedad o afección asociada con bacterias patógenas en un sujeto, por ejemplo, bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* o Streptococcus Grupo B o *S. aureus* o *Enterococcus*, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpo

5 policlonal o monoclonal, y el uso de dicho anticuerpo o de dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la divulgación también pueden ser útiles para procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, la detección de la presencia de o la cuantificación de los niveles de polisacárido capsular o un glucoconjugado del mismo. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación también pueden ser útiles para detectar la presencia de o cuantificar los niveles de un polisacárido de Pn o Mn o GBS o *S. aureus* o de *Enterococcus* o un glucoconjugado de los mismos, en los que el glucoconjugado comprende el polisacárido capsular bacteriano conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eT.

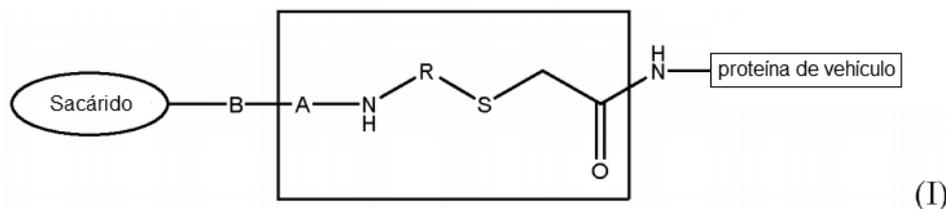
10 Se pueden usar varios ensayos y modelos animales conocidos en la materia para evaluar la eficacia de una cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento. Por ejemplo, Chiavolini y col. Clin. Microbiol. Rev. (2008), 21(4):666-685 describe modelos animales de enfermedades de *S. pneumoniae*. Gorringer y col. METHODS IN MOLECULAR MEDICINE, vol. 66 (2001), Capítulo 17, Pollard y Maiden eds. (Humana Press Inc.) describen modelos animales para enfermedades meningocócicas.

Ensayo de actividad opsonofagocítica (OPA)

15 Los procedimientos del ensayo OPA se basaron en los procedimientos descritos previamente por Hu, y col. (Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005; 12(2):287-95), con las siguientes modificaciones. Los sueros inactivados por calor se diluyeron de manera seriada a 2,5 veces en tampón. Se añadieron las bacterias diana a las placas de ensayo y se incubaron durante 30 minutos a 25 °C en un agitador. Las células del complemento de cría de conejo (de 3 a 4 semanas de vida, Pel-Freez, a una concentración final del 12,5 %) y las células HL-60 diferenciadas, se añadieron después a cada pocillo a una proporción aproximada de efector frente a diana de 200:1. Las placas de ensayo se incubaron durante 45 minutos a 37 °C en un agitador. Para finalizar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a todos los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 10 µl a los pocillos de placas de filtro MultiScreenHTS HV que contienen 200 µl de agua. El líquido se filtró a través de las placas al vacío, y se añadieron 150 µl de medio HySoy a cada pocillo y se filtró. Después se incubaron las placas de filtro a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante toda la noche y después se fijaron con solución de decoloración (Bio-Rad). Las placas se tiñeron después con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Se obtuvieron imágenes de las colonias y se contaron sobre un analizador Cellular Technology Limited (CTL) ImmunoSpot Analyzer®. El título de anticuerpos de OPA se interpoló a partir del recíproco de las dos diluciones séricas que abarcan el punto de reducción del 50 % en el número de colonias bacterianas cuando se compara con los pocillos de control que no contenían suero inmunológico.

Las realizaciones particulares de la divulgación se exponen en los siguientes párrafos numerados:

- 30 1. Un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio).
2. El glucoconjugado del párrafo 1 que tiene la fórmula general (I):



en la que:

- 35 A es un grupo (C=X)_m en el que X es S u O y m es 0 o 1;
 B es un enlace, O o CH₂; y cuando m es 0, B también puede ser (C=O);
 R es un alquileo C₂-C₁₆, heteroalquileo C₂-C₁₆, alquileo NH-C(=O)-C₂-C₁₆ o heteroalquileo NH-C(=O)-C₂-C₁₆, en el que dicho alquileo y heteroalquileo se sustituyen opcionalmente por 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de COOR' en el que R' se selecciona de H, metilo, etilo o propilo.
- 40 3. El glucoconjugado del párrafo 2 en el que X es O y m es 1.
 4. El glucoconjugado del párrafo 2 en el que X es S y m es 1.
 5. El glucoconjugado del párrafo 2 en el que m es 0.
 6. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 2 a 5 en el que B es un enlace.
 7. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 2 a 5 en el que B es O.
 45 8. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 2 a 5 en el que B es CH₂.

9. El glucoconjugado del párrafo 2 en el que m es 0 y B es (C=O).

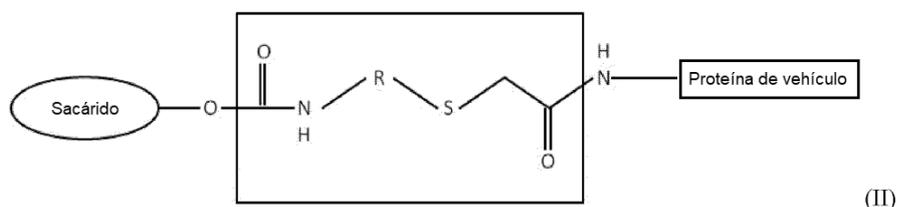
10. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 2 a 9 en el que R se selecciona de los grupos que consisten en (CH₂)₂, (CH₂)₃, (CH₂)₄, (CH₂)₅, (CH₂)₆, (CH₂)₇, (CH₂)₈, (CH₂)₉ o (CH₂)₁₀.

11. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 2 a 9 en el que R es un heteroalquileo C₂-C₁₆.

5 12. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 2 a 9 en el que R se selecciona de los grupos que consisten en O-CH₂, O-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂-(N-CH₃)-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-(N-CH₃)-CH₂-CH₂ y CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂.

13. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 1 a 12 con la condición de que dicho espaciador no sea el espaciador (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC).

10 14. El glucoconjugado del párrafo 1 que tiene la fórmula general (II):



en la que R es (CH₂)_n en la que n es 3 a 10.

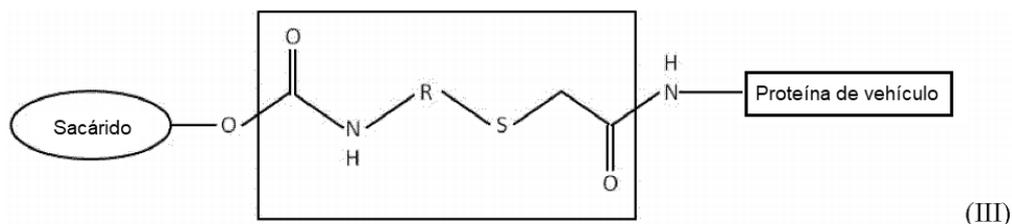
15. El glucoconjugado del párrafo 14 en el que n es 3.

16. El glucoconjugado del párrafo 14 en el que n es 4.

15 17. El glucoconjugado del párrafo 14 en el que n es 5.

18. El glucoconjugado del párrafo 14 en el que n es 6.

19. El glucoconjugado del párrafo 1 que tiene la fórmula general (III):



20 en la que R es selecciona de (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂, CH(COOH)(CH₂)_n, NHCO(CH₂)_n, NHCO(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂, OCH₂(CH₂)_n o O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂; en la que n se selecciona de 1 a 10 y m se selecciona de 1 a 4.

20. El glucoconjugado del párrafo 19 en el que R es CH(COOH)(CH₂)_n y en el que n se selecciona de 1 a 10.

21. El glucoconjugado del párrafo 19 en el que R es NHCO(CH₂)_n y en el que n se selecciona de 1 a 10.

22. El glucoconjugado del párrafo 19 en el que R es OCH₂(CH₂)_n y en el que n se selecciona de 1 a 10.

25 23. El glucoconjugado del párrafo 19 en el que R es (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂ y en el que m se selecciona de 1 a 4.

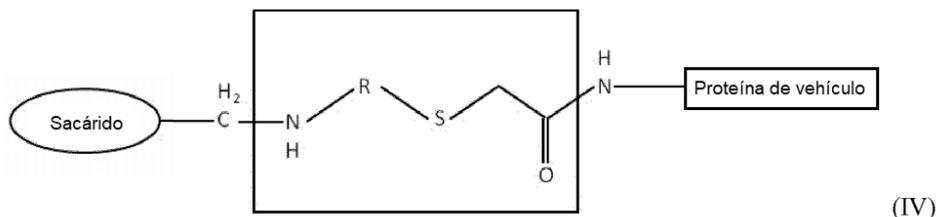
24. El glucoconjugado del párrafo 19 en el que R es NHCO(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂ y en el que m se selecciona de 1 a 4.

25. El glucoconjugado del párrafo 19 en el que R es O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂ y en el que m se selecciona de 1 a 4.

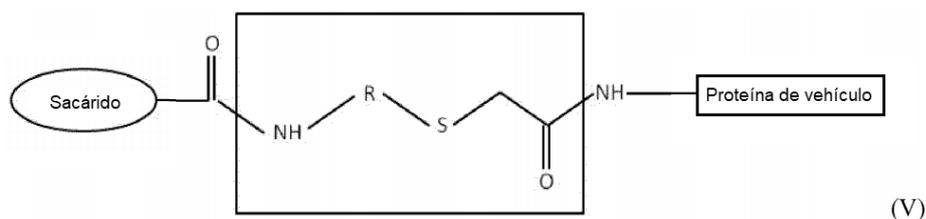
26. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 19 a 22 en el que n es 1 a 5.

30 27. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 19 a 22 en el que n es 1 a 4.

28. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 19 a 22 en el que n es 1 a 3.
 29. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 19 a 22 en el que n es 1 o 2.
 30. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 19 o 23 a 25 en el que m es 1 a 3.
 31. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 19 o 23 a 25 en el que m es 1 o 2.
 5 32. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 19 o 23 a 25 en el que m es 1.
 33. El glucoconjugado del párrafo 1 que tiene la fórmula general (IV):



- 10 en la que R se selecciona de $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ o $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$; en la que n se selecciona de 1 a 10 y m se selecciona de 1 a 4.
- 10 34. El glucoconjugado del párrafo 33 en el que R es $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
 35. El glucoconjugado del párrafo 33 en el que R es $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
 36. El glucoconjugado del párrafo 33 en el que R es $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
 37. El glucoconjugado del párrafo 33 en el que R es $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
 15 38. El glucoconjugado del párrafo 33 en el que R es $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ y en el que m se selecciona de 1 a 4.
 39. El glucoconjugado del párrafo 33 en el que R es $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ y en el que m se selecciona de 1 a 4.
 40. El glucoconjugado del párrafo 33 en el que R es $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ y en el que m se selecciona de 1 a 4.
 41. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 33 a 37 en el que n es 1 a 5.
 20 42. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 33 a 37 en el que n es 1 a 4.
 43. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 33 a 37 en el que n es 1 a 3.
 44. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 33 a 37 en el que n es 1 o 2.
 45. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 33 o 38 a 40 en el que m es 1 a 3.
 46. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 33 o 38 a 40 en el que m es 1 o 2.
 25 47. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 33 o 38 a 40 en el que m es 1.
 48. El glucoconjugado del párrafo 1 que tiene la fórmula general (V):



- 30 en la que R se selecciona de $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ o $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$; en la que n se selecciona de 1 a 10 y m se selecciona de 1 a 4.

49. El glucoconjugado del párrafo 48 en el que R es $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
50. El glucoconjugado del párrafo 48 en el que R es $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
51. El glucoconjugado del párrafo 48 en el que R es $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
52. El glucoconjugado del párrafo 48 en el que R es $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ y en el que n se selecciona de 1 a 10.
- 5 53. El glucoconjugado del párrafo 48 en el que R es $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ y en el que m se selecciona de 1 a 4.
54. El glucoconjugado del párrafo 48 en el que R es $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ y en el que m se selecciona de 1 a 4.
55. El glucoconjugado del párrafo 48 en el que R es $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ y en el que m se selecciona de 1 a 4.
56. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 48 a 52 en el que n es 1 a 5.
- 10 57. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 48 a 52 en el que n es 1 a 4.
58. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 48 a 52 en el que n es 1 a 3.
59. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 48 a 52 en el que n es 1 o 2.
60. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 48 o 53 a 55 en el que m es 1 a 3.
61. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 48 o 53 a 55 en el que m es 1 o 2.
- 15 62. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 48 o 53 a 55 en el que m es 1.
63. El glucoconjugado del párrafo 1 que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eTAC, en el que el sacárido se une de manera covalente al espaciador de oxo-eTAC a través de una unión de carbamato, y en el que la proteína de vehículo se une de manera covalente al espaciador oxo-eTAC a través de una unión de tioéter y amida.
- 20 64. El glucoconjugado del párrafo 1 que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eTAAN, en el que el sacárido se une de manera covalente al espaciador de oxo-eTAAN a través de una unión de amina, y en el que la proteína de vehículo se une de manera covalente al espaciador oxo-eTAAN a través de una unión de tioéter y amida.
- 25 65. El glucoconjugado del párrafo 1 que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador oxo-eTAAD, en el que el sacárido se une de manera covalente al espaciador de oxo-eTAAD a través de una unión de amina, y en el que la proteína de vehículo se une de manera covalente al espaciador oxo-eTAAD a través de una unión de tioéter y amida.
66. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 1 a 65, en el que el sacárido es un polisacárido o un oligosacárido.
- 30 67. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 1 a 65, en el que el sacárido es un polisacárido capsular derivado de bacterias.
68. El glucoconjugado del párrafo 67, en el que dicho polisacárido capsular deriva de *S. pneumoniae*.
69. El glucoconjugado del párrafo 68, en el que dicho polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 33F y 35B.
- 35 70. El glucoconjugado del párrafo 68, en el que dicho polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 2, 9N, 15A, 17F, 20, 23A, 23B, y 35B.
71. El glucoconjugado del párrafo 68, en el que dicho polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 8, 9V, 9N, 12F y 22F.
- 40 72. El glucoconjugado del párrafo 68, en el que dicho polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 33F.
73. El glucoconjugado del párrafo 68, en el que dicho polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 22F.
- 45 74. El glucoconjugado del párrafo 68, en el que dicho polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 10A.

75. El glucoconjugado del párrafo 68, en el que dicho polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 11A.
76. El glucoconjugado de cualquiera de los párrafos 1 a 65, en el que el sacárido es un sacárido capsular derivado de *N. meningitidis*.
- 5 77. El glucoconjugado del párrafo 75, en el que el sacárido es un polisacárido.
78. El glucoconjugado del párrafo 75, en el que el sacárido es un oligosacárido.
79. El glucoconjugado de los párrafos 75 a 78, en el que el sacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los sacáridos capsulares de los serotipos de Mn A, C, W135 e Y, preferentemente del grupo que consiste en los sacáridos capsulares de los serotipos de Mn C, W135 e Y.
- 10 80. El glucoconjugado de los párrafos 75 a 78, en el que el sacárido capsular de Mn es el sacárido capsular del serotipo de Mn X.
81. El glucoconjugado del párrafo 67, en el que dicho polisacárido capsular deriva de *Streptococcus Grupo B*.
82. El glucoconjugado del párrafo 81, en el que dicho polisacárido capsular de *Streptococcus Grupo B* se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib, II, III o V.
- 15 83. El glucoconjugado del párrafo 67, en el que dicho polisacárido capsular deriva de *Staphylococcus aureus*.
84. El glucoconjugado del párrafo 83, en el que dicho polisacárido capsular de *S. aureus* es el polisacárido capsular de *S. aureus* de serotipo 5 u 8.
85. El glucoconjugado del párrafo 67, en el que dicho polisacárido capsular deriva de bacterias de *Enterococcus*.
- 20 86. El glucoconjugado del párrafo 85, en el que dicho polisacárido capsular de *Enterococcus* es el polisacárido capsular de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.
87. El glucoconjugado del párrafo 67, en el que dicho polisacárido capsular deriva de un polisacárido bacteriano que contiene ácido siálico y/o ácido urónico.
88. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 87, en el que el sacárido tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa.
- 25 89. El glucoconjugado del párrafo 88, en el que el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa.
90. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 89, en el que el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa.
- 30 91. El glucoconjugado del párrafo 90, en el que el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa.
92. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 91, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación entre el 75-100 %.
- 35 93. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 92, en el que la proteína de vehículo se selecciona en el grupo que consiste en TT, DT, mutantes de DT (tales como CRM₁₉₇), proteína D de *H. influenzae*, PhtX, PhtD, fusiones PhtDE, neumolisina detoxificada, PorB, proteína N19, PspA, OMPC, toxina A o B de *C. difficile* y PsaA.
94. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 92, en el que la proteína de vehículo se selecciona en el grupo que consiste en TT, DT, CRM₁₉₇ y proteína D de *H. influenzae*.
95. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 92, en el que la proteína de vehículo es CRM₁₉₇.
- 40 96. El glucoconjugado del párrafo 95, en el que la CRM₁₉₇ comprende de 2 a 20 restos de lisina enlazados de manera covalente al polisacárido a través de un espaciador oxo-eT.
97. El glucoconjugado del párrafo 95, en el que la CRM₁₉₇ comprende de 4 a 16 restos de lisina enlazados de manera covalente al polisacárido a través de un espaciador oxo-eT.
- 45 98. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 97, en el que la proporción de sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 0,2 y 4.
99. El glucoconjugado del párrafo 98, en el que la proporción de sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre

0,4 y 1,7.

100. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 99, en el que se da un enlace entre la proteína de vehículo y el sacárido en cada 25 unidades de repetición del sacárido.
- 5 101. El glucoconjugado del párrafo 100, en el que se da un enlace entre la proteína de vehículo y el sacárido en cada 15 unidades de repetición del sacárido.
102. El glucoconjugado del párrafo 100, en el que se da un enlace entre la proteína de vehículo y el sacárido en cada 10 unidades de repetición del sacárido.
103. El glucoconjugado del párrafo 100, en el que se da un enlace entre la proteína de vehículo y el sacárido en cada 4 unidades de repetición del sacárido.
- 10 104. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 98 a 103, en el que dicha proteína de vehículo es CRM₁₉₇.
105. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 104, que comprende menos del 15 % de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido.
- 15 106. El glucoconjugado de uno cualquiera de los párrafos 1 a 105, que tiene una distribución de tamaño molecular (Kd) de $\geq 35\%$ a $\leq 0,3$.
107. Una composición inmunogénica que comprende al menos un glucoconjugado tal como se define en cualquiera de los párrafos 1 a 106.
108. Una composición inmunogénica que comprende al menos un glucoconjugado tal como se define en cualquiera de los párrafos 1 a 106 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 109. La composición inmunogénica del párrafo 107 o 108, que además comprende un antígeno adicional.
110. La composición inmunogénica del párrafo 109, en la que el antígeno adicional comprende un antígeno proteico o un glucoconjugado de un polisacárido capsular derivado de *S. pneumonia*.
- 25 111. La composición inmunogénica del párrafo 110, en la que el antígeno bacteriano es un polisacárido capsular seleccionado del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.
112. La composición inmunogénica del párrafo 109, en la que el antígeno adicional comprende un antígeno proteico o un glucoconjugado de un polisacárido capsular derivado de *N. meningitidis*.
113. La composición inmunogénica del párrafo 109, en la que el antígeno bacteriano es un polisacárido capsular seleccionado del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos A, C, W135 e Y.
- 30 114. La composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 107 a 113, que comprende adicionalmente un adyuvante.
115. La composición inmunogénica del párrafo 114, en la que el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio.
116. La composición inmunogénica del párrafo 114, en la que el adyuvante es un fosfato de aluminio.
117. La composición inmunogénica del párrafo 114, en la que el adyuvante es un hidróxido de aluminio.
- 35 118. Un recipiente cargado con cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en uno cualquiera de los párrafos 107 a 117.
119. El recipiente del párrafo 118 seleccionado del grupo que consiste en un frasco, una jeringa, un matraz, un fermentador, un biorreactor, una bolsa, un jarro, una ampolla, un cartucho y un bolígrafo desechable.
- 40 120. Un procedimiento para preparar un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC), que comprende las etapas de:
- 45 a) hacer reaccionar un sacárido con un derivado de ácido carbónico o derivado de cianógeno, para producir un sacárido activado;
- b) hacer reaccionar el sacárido activado con un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol o una sal del mismo, para producir un sacárido tiolado;
- c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente desprotector o reductor para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres;
- d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o

- más grupos α -haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y
- e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α -haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado;
- 5 mediante el cual se produce en un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAC.
121. El procedimiento del párrafo 120, en el que el derivado de ácido carbónico de la etapa a) es 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) o disuccinimidil carbonato (DSC) o N-hidroxisuccinimidil cloroformato.
- 10 122. El procedimiento del párrafo 121, en el que el derivado de ácido carbónico de la etapa a) es 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT).
123. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 122, en el que la etapa a) se realiza en un disolvente orgánico.
- 15 124. El procedimiento del párrafo 123, en el que dicho disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, tal como dimetilsulfóxido (DMSO).
125. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 124, en el que el sacárido tiolado se produce mediante la reacción del sacárido activado con un reactivo de tioalquilamina heterobifuncional o una sal del mismo.
126. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 125, en el que el primer reactivo de tapado es N-acetil-L-cisteína.
- 20 127. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 126, en el que el segundo reactivo de tapado es yodoacetamida (IAA).
128. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 127, en el que la etapa e) comprende el tapado con un primer reactivo de tapado y con un segundo reactivo de tapado.
- 25 129. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 125, en el que la etapa e) comprende el tapado con N-acetil-L-cisteína como el primer reactivo de tapado e IAA como el segundo reactivo de tapado.
130. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 129, en el que la etapa de tapado e) comprende adicionalmente la reacción con un agente de reducción, por ejemplo, DTT, TCEP o mercaptoetanol, tras la reacción con el primer y/o el segundo reactivo de tapado.
- 30 131. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 129, en el que la etapa d) comprende adicionalmente proporcionar una proteína de vehículo activa que comprende uno o más grupos de α -haloacetamida antes de hacer reaccionar el sacárido tiolado activo con la proteína de vehículo activada.
132. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 131, en el que la proteína de vehículo activa comprende uno o más grupos α -bromoacetamida.
- 35 133. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 132, en el que dicha proteína de vehículo activa es la proteína de vehículo activa CRM197 que comprende uno o más grupos α -bromoacetamida.
134. Un procedimiento para preparar un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)amina (oxo-eTAAN), que comprende las etapas de:
- 40 a) hacer reaccionar un sacárido con un reactivo oxidante para generar grupos aldehído para producir un sacárido activado;
- b) hacer reaccionar el sacárido activado con un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol (en formas protegidas o libres) del extremo amino del enlazador, para producir un sacárido tiolado mediante aminación reductiva;
- 45 c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente desprotector o un agente reductor (si el tiol está protegido) para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres;
- d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y
- e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α -haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado;
- 50 mediante el cual se produce en un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAAN.

135. El procedimiento del párrafo 134 en el que el sacárido de la etapa a) se oxida mediante el sistema de reactivos 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO)/N-Clorosuccinimida (NCS).

136. Un procedimiento para preparar un carboxilo que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)amida (oxo-eTAAD), que comprende las etapas de:

- 5 a) hacer reaccionar primero el sacárido que contiene el grupo carboxilo para generar un sacárido activado con una carbodiimida o un derivado de la misma;
- b) hacer reaccionar el sacárido activado con un enlazador heterobifuncional que contiene funciones de amina y de tiol (en forma protegida o libre) del extremo amino, para producir un sacárido tiolado;
- 10 c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente desprotector o reductor (si está protegido) para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres;
- d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y
- 15 e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α -haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado;

mediante el cual se produce en un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAAD.

20 137. El procedimiento del párrafo 136 en el que el derivado de carbodiimida es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida.

138. El procedimiento del párrafo 136 en el que el derivado de carbodiimida es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

139. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 136 a 138, en el que la etapa a) se realiza en un disolvente orgánico.

25 140. El procedimiento del párrafo 139, en el que dicho disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, tal como dimetilsulfóxido (DMSO).

141. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 136 a 140 en el que la etapa a) de activación de ácido carboxílico se realiza mediante carbodiimida y tiazolidinona tiona.

30 142. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 136 a 140 en el que la etapa a) de activación de ácido carboxílico se realiza mediante N-etil-3-fenilisoxazolio-3'-sulfonato (reactivo K de Woodward).

143. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 120 a 142, que además comprende la purificación del polisacárido tiolado producido en la etapa c), en el que la etapa de purificación comprende la diafiltración.

144. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 143, en el que la proteína de vehículo se activa con un derivado de ácido bromoacético activado.

35 145. El procedimiento del párrafo 144, en el que el derivado de ácido bromoacético es el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (BAANS).

146. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 145, en el que el procedimiento comprende adicionalmente la purificación del glucoconjugado mediante diafiltración.

40 147. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 146, en el que la etapa a) se lleva a cabo en un disolvente aprótico polar seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona (NMP), acetonitrilo, 1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU) y hexametilfosforamida (HMPA) o una mezcla de los mismos.

148. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 147, en el que la proporción de sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 0,2 y 4.

45 149. El procedimiento del párrafo 148, en el que la proporción de sacárido : proteína de vehículo (p/p) está entre 0,4 y 1,7.

150. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 149, en el que el sacárido es un polisacárido capsular derivado de *S. pneumoniae*.

50 151. El procedimiento del párrafo 150, en el que el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos neumocócicos (Pn) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

152. El procedimiento del párrafo 150, en el que el polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 33F.
153. El procedimiento del párrafo 150, en el que el polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 22F.
- 5 154. El procedimiento del párrafo 150, en el que el polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 10A.
155. El procedimiento del párrafo 150, en el que el polisacárido capsular es un polisacárido capsular del serotipo de Pn 11A.
- 10 156. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 149, en el que el sacárido es un polisacárido capsular derivado de *N. meningitidis*.
157. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 156, en el que la proteína de vehículo es CRM₁₉₇.
158. Un glucoconjugado producido por el procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 120 a 157.
159. Una composición inmunogénica que comprende el glucoconjugado del párrafo 158 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 160. La composición inmunogénica del párrafo 159 que además comprende un adyuvante.
161. La composición inmunogénica del párrafo 160, en el que el adyuvante a base de aluminio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.
162. Un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 107 a 117 o 159 a 161.
- 20 163. Un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 107 a 117 o 159 a 161.
164. Los glucoconjugados de cualquiera de los párrafos 1 a 106 o la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 107 a 117 o 159 a 161 para su uso como un medicamento.
- 25 165. Los glucoconjugados de cualquiera de los párrafos 1 a 106 o la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 107 a 117 o 159 a 161 para su uso como una vacuna.
166. Los glucoconjugados de cualquiera de los párrafos 1 a 106 o la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 107 a 117 o 159 a 161 para su uso en un procedimiento de la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto. 167. Los glucoconjugados de cualquiera de los párrafos 1 a 106 o la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 107 a 117 o 159 a 161 para su uso en un procedimiento de la prevención de una infección bacteriana en un sujeto.
- 30
- La divulgación anterior generalmente describe la presente invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas. Se puede obtener un entendimiento más completo en referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención. Cualquier efecto que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones no forma parte de la invención.
- 35

Ejemplos

Ejemplo 1. Procedimiento general para la preparación de glucoconjugados enlazados a eTEC

40 Activación de sacárido y tiolación con dihidrocloruro de cistamina

El sacárido se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución se determina mediante análisis de Karl Fischer (KF) y se ajusta para que alcance un contenido de humedad del 0,1 y 0,4 %, típicamente el 0,2 %.

- 45 Para iniciar la activación, se prepara recientemente una solución de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activa con diversas cantidades de CDT/CDI (1- 10 equivalentes molares) y se permite que proceda la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C. El nivel de activación se puede determinar mediante HPLC. El dihidrocloruro de cistamina se prepara recientemente en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. Se hace reaccionar el sacárido activado con 1 eq. mol. de dihidrocloruro de cistamina. Como alternativa, se hace reaccionar el sacárido activado con 1 eq. mol. de hidrocloreuro de cisteamina. Se permite que proceda la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C, para producir un sacárido
- 50

tiolado. El nivel de tiolación se determina mediante la cantidad añadida de CDT/CDI.

El CDT/CDI residual en la solución de la reacción de activación se inactiva mediante la adición de una solución de tetraborato de sodio 100 mM, a pH 9,0. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para ajustar el contenido de humedad final para que sea de hasta el 1-2 % del total acuoso.

5 Reducción y purificación del sacárido tiolado activado

La mezcla de reacción de sacárido tiolado se diluye 10 veces mediante la adición a succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtra a través de un filtro de 5 μ m. La diafiltración del sacárido tiolado se realiza frente a un diavolumen de WFI de 40 veces. Al retenido se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol., tras la dilución al 10 % de volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M a pH 6,0. Se permite que esta reacción de reducción proceda durante 20 ± 2 horas a 5 ± 3 °C. La purificación del sacárido tiolado activado se realiza preferentemente mediante ultrafiltración/diafiltración de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Como alternativa, el sacárido tiolado se purifica mediante procedimientos convencionales cromatográficos de exclusión por tamaño (SEC) o procedimientos de cromatografía de intercambio iónico.

15 Se extrae una alícuota de retenido de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido en tiol (Ellman).

Reducción y purificación alternativa del sacárido tiolado activado

Como alternativa al procedimiento de purificación descrito anteriormente, también se purificó el sacárido tiolado activado como a continuación.

20 A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), de 5 - 10 eq. mol., y se permitió que procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción se diluyó después 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 μ m. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Se extrajo una alícuota de retenido de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido en tiol (Ellman).

Activación y purificación de proteína de vehículo bromoacetilada

Los grupos amino libres de la proteína de vehículo se bromoacetilan mediante la reacción con un agente de bromoacetilación, tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (BAANS), bromoacetilbromuro u otro reactivo adecuado.

30 La proteína de vehículo (en fosfato de sodio 0,1 M, a pH $8,0 \pm 0,2$) se mantiene primero a 8 ± 3 °C, a aproximadamente pH 7 antes de la activación. A la solución de proteína, el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (BAANS) como una solución madre de dimetilsulfóxido (DMSO) (20 mg/ml) se añade en una proporción de BAANS: proteína de 0,25 - 0,5 (p/p). La reacción se mezcla suavemente a 5 ± 3 °C durante 30 - 60 minutos. La proteína bromoacetilada resultante (activada) se purifica, por ejemplo, mediante
35 ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de CPM de 10 kDa que usa tampón fosfato 10 mM (a pH 7,0). Tras la purificación, la concentración de proteína de la proteína de vehículo bromoacetilado se estima mediante el ensayo proteínico de Lowry.

El grado de activación se determina mediante ensayo de bromuro total mediante cromatografía líquida de intercambio iónico acoplada con detección de conductividad suprimida (cromatografía de iones). El bromuro unido en la proteína bromoacetilada activada se escinde de la proteína en la preparación de la muestra del ensayo y se cuantifica junto con cualquier bromuro libre que pueda estar presente. Cualquier bromo restante unido de manera covalente a la proteína se libera mediante la conversión a bromuro iónico mediante el calentamiento de la muestra en 2-mercaptoetanol alcalino.

Activación y purificación de CRM₁₉₇ bromoacetilado

45 La CRM₁₉₇ se diluyó a 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM a pH 7 (PBS) y después se preparó NaHCO₃ 0,1 M a pH 7,0 usando solución madre 1 M. Se añadió BAANS a una proporción de CRM₁₉₇ : BAANS de 1 : 0,35 (p:p) usando una solución madre de BAANS de 20 mg/ml de DMSO. La mezcla de reacción se incubó a entre 3 °C y 11 °C durante 30 minutos - 1 hora, después se purificó mediante ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de CPM de 10 K y fosfato de sodio 10 mM/NaCl al 0,9 %, a pH 7,0. La CRM₁₉₇ activada purificada se
50 ensayó mediante ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y después se diluyó con PBS a 5 mg/ml. Se añadió sacarosa al 5 % de p/vol como un crioprotector y la proteína activada se congeló y se almacenó a -25 °C hasta que se necesitó para la conjugación.

La bromoacetilación de restos de lisina de CRM₁₉₇ fue muy consistente, dando como resultado la activación de 15 a 25 lisinas de 39 lisinas disponibles. La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Conjugación de sacárido tiolado activado con proteína de vehículo bromoacetilada

Antes de comenzar la reacción de conjugación, los recipientes de reacción se enfrían previamente a 5 °C. La proteína de vehículo bromoacetilada y el sacárido tiolado activado se añaden posteriormente y se mezclan a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína es $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajusta a $8,0 \pm 0,1$ con solución NaOH 1 M. La reacción de conjugación se permite que proceda a 5 °C durante 20 ± 2 horas.

Tapado de grupos funcionales reactivos residuales

Los restos bromoacetilados que no han reaccionado sobre la proteína de vehículo se inactivan mediante la reacción con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína como un reactivo de tapado durante 3 horas a 5 °C. Los grupos residuales de sulfhidrilo libres se tapan con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 °C.

Purificación de glucoconjugado enlazado a eTEC

La mezcla de reacción de conjugación (tapada con post-IAA) se filtra a través de un filtro de 0.45 µm. La ultrafiltración/diafiltración del glucoconjugado se realiza frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. El retenido del conjugado después se filtra a través de un filtro de 0,2 µm. Se extrae una alícuota de glucoconjugado para ensayos. El glucoconjugado restante se almacena a 5 °C.

Ejemplo 2. Preparación de conjugados de Pn-33F eTECProcedimiento de activaciónActivación del polisacárido Pn33F

El polisacárido Pn-33F se combinó con 500 mM de 1,2,4,-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congeló en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofilizó hasta la sequedad. El polisacárido 33F liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido en humedad de la solución de 33F liofilizado/DMSO se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajustó añadiendo WFI a la solución de 33F/DMSO hasta alcanzar un contenido de humedad del 0,2 %.

Para iniciar la activación, el 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) se preparó recientemente como 100 mg/ml en solución de DMSO. El polisacárido Pn33F se activó con diversas cantidades de CDT antes de la etapa de tiolación. La activación de CDT se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 1 hora. El nivel de activación se determinó mediante HPLC (A220/A205). Se añadió una solución de tetraborato de sodio 100 mM a pH 9,0 para inactivar cualquier CDT residual en la solución de reacción de activación. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final sea del 1,2 % del total acuoso. Se permitió que procediese la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C.

Tiolación de polisacárido Pn-33F activado

Se preparó recientemente el dihidrocloruro de cistamina en DMSO anhidro y se añadió 1 eq. mol. de dihidrocloruro de cistamina a la solución de reacción de polisacárido activado. Se permitió que la reacción procediese durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C. La solución de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La solución de reacción diluida se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K, usando agua para inyección (WFI, del inglés, *Water for Injection*).

Reducción y purificación del polisacárido Pn-33F tiolado activado

Al retenido se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), de 5 eq. mol., tras la dilución al 10 % de volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Se permitió que procediese esta reacción de reducción durante 2 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La diafiltración del polisacárido 33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. La diafiltración se realizó frente a fosfato de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. El retenido de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Reducción y purificación alternativa del polisacárido Pn-33F tiolado activado

Como alternativa al procedimiento de purificación descrito anteriormente, el sacárido 33F tiolado activado también se purificó como sigue.

A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), de 5 eq. mol., y se permitió que procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción se diluyó después 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40

veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3 con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. El retenido de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Procedimiento de conjugación

5 Conjugación del polisacárido Pn33F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

La proteína de vehículo CRM₁₉₇ se activó por separado mediante bromoacetilación, tal como se describe en el Ejemplo 1, y después se hizo reaccionar con el polisacárido Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de la reacción se enfrió previamente a 5 °C. La CRM₁₉₇ bromoacetilada y el polisacárido 33F tiolado se mezclaron juntos en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína fue 0,9 ± 0,1. El pH de la reacción se ajustó a 8,0 - 9,0. Se permitió que procediese la reacción de conjugación a 5 °C durante 20 ± 2 horas.

Tapado de los grupos reactivos en CRM₁₉₇ bromoacetilada y en polisacárido Pn33F tiolado

Los restos bromoacetilados sin reaccionar sobre las proteínas CRM₁₉₇ se taparon haciéndolos reaccionar con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína durante 3 horas a 5 °C, seguido por un tapado de cualquiera de los grupos sulfhidrilo libres residuales del polisacárido 33F tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 °C.

Purificación del glucoconjugado Pn-33F enlazado a eTEC

La solución de conjugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm o de 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 300K. La diafiltración se realizó frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. Después se filtró el retenido de 300K del glucoconjugado Pn-33F a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 5 °C.

Resultados

Los parámetros de la reacción y los datos de la caracterización para varios lotes de glucoconjugados Pn-33F eTEC se muestran en la **Tabla 2**. La activación-tiolación de CDT con dihidrocloruro de cistamina generó glucoconjugados que tienen producción de sacáridos del 63 al 90 % y <1 % a 13 % de sacáridos libres.

25 **Tabla 2. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados Pn33F eTEC**

Lote del conjugado	33F-1A	33F-2B	33F-3C	33F-4D	33F-5E	33F-6F	33F-7G
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,21	0,13	0,164	0,103	0,183	0,22	0,19
Nivel de activación (% de tiol)	21	13	16,4	10,3	18,3	22	19
Proporción de sacárido/proteína (entrada)	0,75	1,0	0,75	1,0	1,0	0,75	0,80
Producción de sacáridos (%)	69 %	63 %	71 %	63 %	69 %	82 %	90 %
Proporción de sacárido/proteína	1,3	1,7	1,2	1,9	1,6	1,1	1,5
Sacárido libre	12,9 %	7,7 %	4,4 %	7,2 %	7,3 %	< 4 %	< 4 %
PM por SEC-MALLS (kDa)	2627	2561	4351	2981	3227	3719	5527
CMCA/CMC	14,4/0	13,4/0	6,8/1,9	2,7/0,6	5,9/0,6	8,2/0	11,4/0,6
% de Kd (≤ 0,3)	ND	85 %	88 %	75 %	68 %	67 %	76 %
Nivel de acetilación (mol de acetato/mol de polisacárido)	0,89	1,16	0,99	0,85	0,81	0,85	1,01

Títulos de OPA de glucoconjugados Pn-33F eTEC con CRM₁₉₇

Los títulos de OPA de Pn-33F en ratones se determinaron en condiciones estándar. Los títulos de OPA (GMT con CI al 95 %) a cuatro y siete semanas se muestran en la Tabla 3, demostrando que el glucoconjugado del serotipo de Pn 33F generó títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad en murino.

30 **Tabla 3. Títulos de OPA de Pn-33F (GMT con CI al 95%)**

Conjugado de Pn 33F	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
semana 4	4 (4, 5)	37 (17, 82)	414 (234, 734)
semana 7	8 (5, 13)	131 (54, 314)	17567 (9469, 32593)

Ejemplo 3. Preparación de conjugados de Pn-22F eTEC

Procedimiento de activaciónActivación del polisacárido Pn-22F

5 El polisacárido Pn-22F se combinó con 500 mM de 1,2,4,-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congeló en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofilizó hasta la sequedad. El polisacárido 22F liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido en humedad de la solución de 22F liofilizado/DMSO se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajustó añadiendo WFI a la solución de Pn-22F/DMSO hasta alcanzar un contenido de humedad del 0,2 %.

10 Para iniciar la activación, el 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) se preparó recientemente como 100 mg/ml en solución de DMSO. El polisacárido Pn-22F se activó con diversas cantidades de CDT seguido por la tiolación con 1 eq. mol. de dihidrocloruro de cistamina. La activación de CDT se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 1 hora. El nivel de activación se determinó mediante HPLC (A220/A205). Se añadió una solución de tetraborato de sodio 100 mM a pH 9,0 para inactivar cualquier CDT residual en la solución de reacción de activación. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final sea del 1,2 % del total acuoso. Se permitió que procediese la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C.

Tiolación de polisacárido Pn-22F activado

20 Se preparó recientemente el dihidrocloruro de cistamina en DMSO anhidro y se añadió a la solución de reacción. Se permitió que la reacción procediese durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C. La solución de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La solución de reacción diluida se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-22F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K, usando agua para inyección (WFI, del inglés, *Water for Injection*).

Reducción y purificación del polisacárido Pn-22F tiolado activado

25 Al retenido se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), de 5 - 10 eq. mol., tras la dilución al 10 % de volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Se permitió que procediese esta reacción de reducción durante 2 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La diafiltración del polisacárido 22F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. La diafiltración se realizó frente a fosfato de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. El retenido de polisacárido 22F tiolado se extrajo tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Conjugación, tapado y purificación de glucoconjugados Pn-22F eTEC

30 La conjugación del polisacárido Pn22F tiolado activado con CRM₁₉₇, el tapado y la purificación de los glucoconjugados Pn-22F eTEC se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2**.

Resultados

35 Los datos de la caracterización y del procedimiento para los glucoconjugados de Pn-22F eTEC con CRM₁₉₇ se proporcionan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados 22F eTEC

Lote del conjugado	Pn-22F-1A	Pn-22F-1B	Pn-22F-1C	Pn-22F-1D
PM del polisacárido (kDa)	638,5 kDa	638,5 kDa	638,5 kDa	638,5 kDa
Activación del poli.				
Eq. Mol. de CDT	0,6 equiv. mol.	0,9 equiv. mol.	1,2 equiv. mol.	1,5 equiv. mol.
Eq. Mol. de tiol	1 eq. mol. de cistamina 2H Cl			
Eq. Mol. de reductor	10 eq. mol. de TCEP			
Producción	86 %	89 %	71 %	86 %
Nivel de tiol (activación) (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,05	0,09	0,12	0,16
Nivel de activación (% de tiol)	5	9	12	16
Conjugación con CRM197				
Proporción de entrada	0,75	0,75	0,75	0,75

(continuación)

Resultados de la conjugación				
Lote del conjugado	Pn-22F-1A	Pn-22F-1B	Pn-22F-1C	Pn-22F-1D
Producción de sacáridos (%)	55 %	48 %	56 %	35 %
Proporción de sacárido/proteína	1,4	1,2	1,1	1,1
Sacárido libre	29,7 %	16,8 %	9,1 %	10,1 %
Proteína libre	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
Pm por SEC-MALLS	1808 kDa	1787 kDa	1873 kDa	2248 kDa

Ejemplo 4. Preparación de conjugados de Pn-10A eTEC con CRM₁₉₇

Preparación de Glucoconjugados de Pn-10A eTEC

5 Los glucoconjugados que comprenden el polisacárido capsular neumocócico del serotipo 10A (Pn-10A) conjugado con CRM₁₉₇ a través del espaciador eTEC se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2**.

Caracterización de glucoconjugados Pn-10A eTEC

Los datos de la caracterización y del procedimiento para los glucoconjugados de Pn-10A eTEC con CRM₁₉₇ se proporcionan en la **Tabla 5**.

10 **Tabla 5. Parámetros experimentales y datos de caracterización para glucoconjugados Pn-10A**

Lote de conjugación	Pn-10A-1	Pn-10A-2	Pn-10A-3	Pn-10A-4	Pn-10A-5
PM del sacárido (kDa)	538	128	128	128	128
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,13	0,18	0,29	0,34	0,43
Nivel de activación (% de tiol)	13	18	29	34	43
PM del conjugado (kDa)	2510	950	800	909	1090
% de producción (sacárido)	67 %	42 %	53 %	55 %	50 %
% de sacárido libre	20	4,5	< 4	< 4	< 4
Kd (% ≤ 0,3)	71 %	36 %	38 %	35 %	37 %
Proteína libre	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
restos de CMCA	ND	9,8	14,6	15,9	18,5

Títulos de OPA de Pn-10A

Los títulos de OPA frente al conjugado de Pn-10A eTEC con CRM₁₉₇ en ratones se determinaron en condiciones estándar. Los títulos de OPA como una función de la dosis se muestran en la **Tabla 6**. Los títulos de OPA fueron significativamente mayores para el conjugado en relación con el polisacárido de serotipo 10A no conjugado.

15 **Tabla 6. Títulos de OPA de Pn-10A (GMT con CI al 95%)**

Variante de Pn 10A	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
Conjugado de Pn-10A eTEC	691 (389, 1227)	1208 (657, 2220)	3054 (1897, 4918)
PS no conjugado			602 (193, 1882)

Ejemplo 5. Preparación de conjugados de Pn-11A eTEC con CRM₁₉₇

Preparación de Glucoconjugados de Pn-11A eTEC

20 Los glucoconjugados que comprenden el polisacárido capsular neumocócico del serotipo 11A (Pn-11A) conjugado con CRM₁₉₇ a través del espaciador eTEC se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2**.

Caracterización de glucoconjugados Pn-11A eTEC

Los datos de la caracterización y del procedimiento para los glucoconjugados de Pn-11A eTEC con CRM₁₉₇ se proporcionan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Parámetros experimentales y datos de caracterización para glucoconjugados Pn-11A

Lote de conjugación	Pn-11A-1A	Pn-11A-1B	Pn-11A-2A	Pn-11A-2B
---------------------	-----------	-----------	-----------	-----------

25

(continuación)

PM del polisacárido	113 kDa	113 kDa	230 kDa	230 kDa
Lote de conjugación	Pn-11A-1A	Pn-11A-1B	Pn-11A-2A	Pn-11A-2B
Eq. Mol. de CDT	5	5	2	2
Eq. Mol. de tiol	0,25	0,07	1	1
Eq. Mol. de TCEP	10	10	10	10
Producción	62 %	51 %	86 %	82 %
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,46	0,14	0,13	0,10
Nivel de activación (% de tiol)	46	14	13	10
Conjugación con CRM₁₉₇				
Proporción de entrada de sacárido/proteína	0,75	0,75	0,75	0,75
Producción de sacáridos	46,4 %	60,4 %	73,3 %	73,9 %
Proporción de sacárido/proteína	0,96	1,9	1,18	1,23
Sacárido libre	< 4 %	55 %	16 %	23 %
Proteína libre	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
PM por SEC-MALLS (kDa)	1203	1074	1524	1884

Títulos de OPA de Pn-11A

Los títulos de OPA frente al conjugado de Pn-11A eTEC con CRM₁₉₇ en ratones se determinaron en condiciones estándar. Los títulos de OPA como una función de la dosis se muestran en la **Tabla 8**.

5

Tabla 8. Títulos de OPA de Pn-11A (GMT con CI al 95%)

Variante de Pn 11A	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
Conjugado de Pn-11A eTEC	206 (166, 256)	906 (624, 1316)	5019 (3648, 6904)

Ejemplo 6. Preparación de conjugados de Pn-33F RAC/Acuoso con CRM₁₉₇

Preparación de glucoconjugados de Pn-33F RAC/Acuoso

Los glucoconjugados Pn-33F se prepararon usando aminación reductiva en fase acuosa (RAC/Acuoso), que se ha aplicado con éxito para producir vacunas de conjugados neumocócicos (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381). Esta estrategia incluye dos etapas. La primera etapa es la oxidación del polisacárido para generar la funcionalidad de aldehído de los dioles adyacentes. La segunda etapa es conjugar el polisacárido activado con los restos de lisina (Lys) de CRM₁₉₇.

En resumen, el polisacárido congelado se descongeló y la oxidación se llevó a cabo en tampón de fosfato de sodio a pH 6,0 mediante la adición de diferentes cantidades de peryodato de sodio (NaIO₄). La concentración y la diafiltración del polisacárido activado se llevaron a cabo y el polisacárido activado purificado se almacenó a 4 °C. El polisacárido activado se combinó con la proteína CRM₁₉₇. La mezcla a conciencia del polisacárido y de CRM₁₉₇ se lleva a cabo antes de colocar el frasco en baño de hielo seco/etanol, seguido por la liofilización de la mezcla de polisacárido/CRM₁₉₇. La mezcla liofilizada se reconstituyó en tampón de fosfato de sodio 0,1 M. La reacción de conjugación se inició mediante la adición de 1,5 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio y la incubación durante 20 horas a 23 °C y 44 horas adicionales a 37 °C. Las reacciones se diluyeron con volumen de 1 x de solución salina al 0,9 % y se taparon usando 2 MEq de borohidruro de sodio durante 3 horas a 23 °C. La mezcla de reacción se diluyó con volumen de 1x de solución salina al 0,9 % y después se filtró a través de un filtro de 0,45 µm antes de la purificación. La concentración y la diafiltración del conjugado se llevó a cabo usando casetes de membrana de UF de CPM de 100K. Se obtuvieron varios conjugados usando el procedimiento descrito anteriormente mediante la variación de diferentes parámetros (por ejemplo, pH, temperatura de las reacciones y concentración del polisacárido).

La producción de polisacárido típica fue de aproximadamente el 50 % para estos conjugados y del 15 % de sacárido libre con PM del conjugado en el intervalo de 2000-3500 kDa.

Sin embargo, el polisacárido natural del serotipo 33F lleva un grupo O-acetilo en su C2 del resto 5-galactofuranosil y se descubrió que -80 % del grupo funcional acetil se elimina mediante el procedimiento de conjugación usando la aminación reductiva en fase acuosa. Se observó que el grupo O-acetilo en la estructura de anillo de cinco miembros (5-galactofuranósido) puede migrar y se puede eliminar con facilidad usando el procedimiento de la química de aminación reductiva en fase acuosa.

Evaluación de estabilidad de glucoconjugado de Pn-33F RAC/Acuoso

Se dispensaron en tubos de polipropileno las alícuotas de conjugado RAC/acuoso representativo preparado mediante el procedimiento anterior. Estos tubos se almacenaron bien a 25 °C o a 37 °C y la estabilidad se controló hasta los 3,5 meses. En cada punto temporal de estabilidad, se evaluaron los niveles de % de sacárido libre. Los datos de estabilidad a ambas temperaturas se resumen en la Tabla 9. Tal como se muestra en la Tabla 9, los niveles de % de sacárido libre aumentaron significativamente a 25 °C y a 37 °C. El aumento en los niveles de % de sacárido libre durante el almacenamiento es un indicador potencial de la degradación del polisacárido en el conjugado.

Tabla 9: Datos de estabilidad para conjugado RAC/Acuoso a 25 °C y 37 °C

N.º de lote	Tiempo			
	0	2 sem	1 M	3,5 M
Sacárido libre (%) a 25 °C				
1-B	8,5	14	14	20
Sacárido libre (%) a 37 °C				
1-B	8,5	17	21	38

sem= semana; M=mes.

Aunque, el polisacárido del serotipo 33F se activó con éxito mediante la reacción con peryodato de sodio y posteriormente se conjugó con CRM₁₉₇ aprovechando la química de la aminación reductiva acuosa, el % de estabilidad de sacáridos libres se obtenido en condiciones aceleradas combinado con la incapacidad de preservar la funcionalidad acetilo (un epítipo clave del polisacárido para inmunogenicidad) durante la conjugación sugirió que el procedimiento RAC/acuoso no es el procedimiento óptimo para la conjugación de serotipo 33F.

Ejemplo 7. Preparación de conjugados de Pn-33F RAC/DMSO con CRM₁₉₇

Preparación de glucoconjugados de Pn-33F RAC/DMSO

En comparación con el procedimiento RAC/acuoso, la conjugación llevada a cabo a través de aminación reductiva en un DMSO (RAC/DMSO) generalmente tiene una probabilidad de de-O-acetilación significativamente menor. A la vista de los retos asociados con la preservación de la funcionalidad del O-acetilo usando el procedimiento RAC/acuoso descrito en el Ejemplo 6, se evaluó una estrategia alternativa usando RAC/disolvente DMSO, que se ha aplicado con éxito para producir vacunas de conjugados neumocócicos (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381).

El polisacárido activado se combinó con sacarosa (al 50 % de p/v en WFI) usando una proporción de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Los componentes se mezclaron bien antes de congelarse en el recipiente en baño de hielo seco/etanol. La mezcla combinada congelada en el recipiente después se liofilizó hasta la sequedad.

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadió DMSO a la CRM₁₉₇ para la reconstitución. El polisacárido activado reconstituido se combinó con la CRM₁₉₇ reconstituida en el recipiente de la reacción. La conjugación se inició mediante la adición de NaCNBH₃ a la mezcla de la reacción. La reacción se incubó a 23 °C durante 20 horas. La terminación de la reacción de conjugación (tapado) se logró mediante la adición de NaBH₄ y la reacción prosiguió durante otras 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con un volumen de tampón de 4 veces de succinato 5 mM-solución salina al 0,9 % a pH 6,0, y después se filtró a través de un filtro de 5 µm antes de la purificación. La concentración y la diafiltración del conjugado se llevó a cabo usando membranas de CPM de 100K. La diafiltración se realizó frente a un tampón de diavolumen de 40 veces de succinato 5 mM - solución salina al 0,9 % a pH 6,0. El retenido se filtró a través de filtros de 0,45 y de 0,22 µm y se analizó.

Se obtuvieron varios conjugados usando el procedimiento descrito anteriormente mediante la variación de diferentes parámetros (por ejemplo, la proporción de entrada de sacárido-proteína, la concentración de la reacción, los Meq de cianoborohidruro de sodio y el contenido en agua). Los datos globales generados a partir de los conjugados preparados mediante el procedimiento RAC/DMSO demostraron ser superiores en comparación con el procedimiento RAC/acuoso, y permitió preparar conjugados con buen rendimiento de conjugación, bajo % de sacárido libre (<5 %) y mayor grado de conjugación (lisinas conjugadas). Además, fue posible preservar más del 80 % de la funcionalidad del acetilo a través del procedimiento de conjugación RAC/DMSO.

Evaluación de estabilidad de glucoconjugados de Pn-33F RAC/DMSO

Se dispensaron en tubos de polipropileno las alícuotas de conjugados de RAC/DMSO representativos preparados mediante el procedimiento anterior, que se almacenaron bien a 4 °C o a 25 °C y se controló la estabilidad se controló durante 3 meses para los sacáridos libres. Tal como se muestra en la Tabla 10, las muestras almacenadas a 4 °C un aumento de sacáridos libres del 4,8 % en 3 meses. Sin embargo, las muestras almacenadas a 25 °C mostraron un aumento del 15,4 % en el % de sacáridos libres en tres meses. El aumento en el % de sacáridos libres en los

conjugados de RAC se atribuye a la degradación del conjugado, particularmente a 25 °C.

Tabla 10. Resultados de estabilidad para el conjugado RAC/DMSO a 4 °C y 25 °C

Tiempo			
0	3 sem	2 M	3 M
Sacárido libre (%) a 4 °C			
4,5	7,9	ND	9,3
Sacárido libre (%) a 25 °C			
4,5	12	15,7	19,9
sem= semana; M=mes.			

5 La estabilidad de otro lote de conjugado de RAC/DMSO también se estudió a 4 °C, 25 °C y 37 °C. En tubos de polipropileno se dispensaron alícuotas y se controlaron las posibles tendencias en el % de sacárido libre. Tal como se muestra en la Tabla 11, las muestras almacenadas a 4 °C mostraron un aumento del 4,7 % en el % de sacáridos libres en 2 meses. El aumento en sacáridos libres fue significativamente mayor a 25 °C y 37 °C, lo que indica la posible degradación del conjugado.

Tabla 11. Resultados de estabilidad para el conjugado RAC/DMSO a 4 °C, 25 °C y 37 °C

Tiempo				
0	1 sem	2 sem	1 M	2 M
Sacárido libre (%) a 4 °C				
7,1	9,5	ND	ND	11,7
Sacárido libre (%) a 25 °C				
7,1	9,3	12,7	14,5	ND
Sacárido libre (%) a 37 °C				
7,1	14	19,1	23,6	ND
sem= semana; M=mes.				

10 Incluso aunque los conjugados generados mediante el procedimiento RAC/DMSO conservaron el grupo O-acetilo, el aumento en el % de sacárido libre observado, particularmente a 25 °C y por encima indicó una posible inestabilidad usando esta vía. A la vista de la presente observación de posibles inestabilidades de los conjugados de RAC/DMSO, el RAC/DMSO no se contempló como óptimo para la conjugación del serotipo 33F y se desarrolló una alternativa química para generar conjugados más estables (los conjugados eTEC).

Ejemplo 8. Preparación de conjugados de Pn-33F eTEC adicionales

15 Los conjugados adicionales de Pn-33F se generaron usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Los parámetros de la reacción y los datos de la caracterización para estos lotes adicionales de glucoconjugados de Pn-33F eTEC se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados adicionales de Pn33F eTEC

Lote del conjugado	33F-8H	33F-9I	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-15O	33F-16P
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,22	0,11	0,11	0,13	0,14	0,13	0,06	0,13	0,11
Proporción de sacárido/proteína (entrada)	0,75	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Producción de sacáridos (%)	78 %	88 %	89 %	67 %	69 %	86 %	81 %	91 %	88 %
Proporción de sacárido/proteína	1,0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,4	2,2	1,9	1,9
Sacárido libre	< 1 %	6,8 %	5,9 %	2,3 %	3,6 %	LDC	8,2 %	3,6 %	6,6 %
PM por SEC-MALLS (kDa)	4729	3293	3295	2246	2498	5539	3070	6009	3789
CMCA/CMC	6,6/LDC	14,2/2,1	15,4/2,1	5,5/1	5,4/1,1	ND/LDC	1,7/1,2	4,1/2,2	2,2/1,2
% de Kd ($\leq 0,3$)	69 %	ND	ND	ND	ND	88 %	87 %	87 %	85 %
Nivel de acetilación (mol de acetato/mol de polisacárido)	0,86	0,93	0,87	1,01	0,99	0,71	0,78	0,8	0,82
LDC=límite de cuantificación.									

Tal como se muestra anteriormente y en la Tabla 12, se obtuvieron varios conjugados de Pn33F usando la conjugación anterior de eTEC. La química de eTEC permitió la preparación de conjugados con alto rendimiento, bajo % de sacárido libre y alto grado de conjugación (lisinas conjugadas). Además, fue posible preservar más del 80 % de la funcionalidad del acetilo usando el procedimiento de conjugación eTEC.

5 **Ejemplo 9. Evaluación de estabilidad de glucoconjugados de Pn-33F eTEC: tendencias de % de sacárido libre**

En tubos de polipropileno se dispensaron alícuotas del lote del conjugado 33F-2B (véase la tabla 2) y se almacenaron a 4 °C, 25 °C y 37 °C, respectivamente, y se controlaron las tendencias en el % de sacáridos libres. Los datos (% de sacárido libre) se muestran en la Tabla 13. Tal como se muestra en esta Tabla, no hubo cambios significativos en el % de sacárido libre.

10

Tabla 13. Estabilidad del % de sacárido libre para el glucoconjugado de Pn-33F eTEC a 4 °C, 25 °C y 37 °C

N.º de lote	Sacárido libre (%)						
	Tiempo						
33F-2B	0	1 sem	3 sem	1 M	2 M	3 M	6 M
	4 °C						
	7,7	ND	8,3	ND	9,7	11,2	13
	25 °C						
	7,7	ND	10,8	ND	11,8	ND	ND
	37 °C						
7,7	12,1	ND	13,4	ND	ND	ND	

sem= semana; M=mes.

La estabilidad acelerada de otro lote de conjugado (Lote 33F-3C) también se llevó a cabo a 37 °C hasta 1 mes. Tal como se muestra en la **Tabla 14**, no hubo cambios significativos en el % de sacárido libre a 37 °C, hasta 1 mes.

Tabla 14. Estabilidad del % de sacárido libre para el glucoconjugado de Pn-33F eTEC a 37 °C

N.º de lote	Sacárido libre (%)				
	Tiempo				
33F-3C	0	1day	1 sem	2 sem	1 M
	37 °C				
	4,4	5,9	6,4	7,1	7,2

15 Para confirmar adicionalmente la estabilidad de conjugados de eTEC, los lotes de conjugados adicionales (33F-3C y 33F-5E (véase la Tabla 2 y la Tabla 12)) almacenados a 4 °C se controlaron hasta aproximadamente un año, en sus posibles tendencias en % de sacáridos libres. Tal como se muestra en la Tabla 15, no hubo cambios significativos en los niveles de % de sacáridos libres para los conjugados almacenados a 4 °C durante un período extendido de hasta aproximadamente un año.

20 **Tabla 15. Estabilidad del % de sacárido libre para los glucoconjugados de Pn-33F eTEC a 4 °C**

N.º de lote	Sacárido libre (%)				
	Tiempo				
	0	3 M	4 M	12 M	14 M
4 °C					
33F-3C	4,4	ND	5,3	ND	7,6
33F-5E	7,3	6,3	ND	7,4	ND
M=mes					

Al contrario de los conjugados de RAC/acuoso y RAC/DMSO, los conjugados del serotipo 33F generados mediante la química de 33F eTEC demostraron ser significativamente más estables sin degradación detectable tal como se controló mediante las tendencias de los sacáridos a diversas temperaturas (tiempo real y acelerado).

25 **Ejemplo 10. Procedimiento general para la preparación de glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC)**

Activación de sacárido y tiolación con espaciador mercaptopropionilhidrazida (MPH)

El sacárido se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución se determina mediante análisis de Karl Fischer (KF) y se ajusta para que alcance un contenido de humedad del 0,1 y 0,4 %, típicamente el 0,2 %.

5 Para iniciar la activación, se prepara recientemente una solución de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activa con diversas cantidades de CDT/CDI (1-10 equivalentes molares) y se permite que proceda la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C. El nivel de activación se puede determinar mediante HPLC. La MPH se prepara recientemente en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. El sacárido activado se hace reaccionar con 1 - 3 eq. mol. de MPH. Se permite que proceda la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C, para producir un sacárido tiolado. El nivel de tiolación se determina mediante la cantidad añadida de CDT/CDI.

El CDT/CDI residual en la solución de la reacción de activación se inactiva mediante la adición de solución de tetraborato de sodio 100 mM, a pH 9,0. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para ajustar el contenido de humedad final para que sea de hasta el 1-2 % del total acuoso.

Purificación del sacárido tiolado activado

15 A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol. y se permitió que la reacción procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción después se diluyó 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realiza usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Se extrae una alícuota de retenido de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido en tiol (Ellman).

Activación y purificación de proteína de vehículo bromoacetilada

Los grupos amino libres de la proteína de vehículo se bromoacetilan mediante la reacción con un agente de bromoacetilación, tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (BAANS), bromoacetilbromuro u otro reactivo adecuado.

25 La proteína de vehículo (en fosfato de sodio 0,1 M, a pH $8,0 \pm 0,2$) se mantiene primero a 8 ± 3 °C, a aproximadamente pH 7 antes de la activación. A la solución de proteína, el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (BAANS) como una solución madre de dimetilsulfóxido (DMSO) (20 mg/ml) se añade en una proporción de BAANS: proteína de 0,25 - 0,5 (p/p). La reacción se mezcla suavemente a 5 ± 3 °C durante 30 - 60 minutos. La proteína bromoacetilada resultante (activada) se purifica, por ejemplo, mediante
30 ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de CPM de 10 kDa que usa tampón fosfato 10 mM (a pH 7,0). Tras la purificación, la concentración de proteína de la proteína de vehículo bromoacetilado se estima mediante el ensayo proteínico de Lowry.

El grado de activación se determina mediante ensayo de bromuro total mediante cromatografía líquida de intercambio iónico acoplada con detección de conductividad suprimida (cromatografía de iones). El bromuro unido en la proteína bromoacetilada activada se escinde de la proteína en la preparación de la muestra del ensayo y se cuantifica junto con cualquier bromuro libre que pueda estar presente. Cualquier bromo restante unido de manera covalente a la proteína se libera mediante la conversión a bromuro iónico mediante el calentamiento de la muestra en 2-mercaptoetanol alcalino.

Activación y purificación de CRM₁₉₇ bromoacetilado

40 La CRM₁₉₇ se diluye a 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM a pH 7 (PBS) y después se preparó NaHCO₃ 0,1 M a pH 7,0 usando solución madre 1 M. Se añade BAANS a una proporción de CRM₁₉₇: BAANS de 1 : 0,35 (p:p) usando una solución madre de BAANS de 20 mg/ml de DMSO. La mezcla de reacción se incuba a entre 3 °C y 11 °C durante 30 minutos-1 hora y después se purifica mediante ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de CPM de 10K y fosfato de sodio 10 mM/NaCl al 0,9 %, a pH 7,0. La CRM₁₉₇ activada purificada se
45 ensaya mediante ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y después se diluyó con PBS a 5 mg/ml. Se añade sacarosa al 5 % de p/vol como un crioprotector y la proteína activada se congela y se almacena a -25 °C hasta que se necesite para la conjugación.

La bromoacetilación de restos de lisina de CRM₁₉₇ es muy consistente, dando como resultado la activación de 15 a 25 lisinas de 39 lisinas disponibles. La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Conjugación de sacárido tiolado activado con proteína de vehículo bromoacetilada

Antes de comenzar la reacción de conjugación, los recipientes de reacción se enfrían previamente a 5 ± 3 °C. La proteína de vehículo bromoacetilada y el sacárido tiolado activado se añaden posteriormente y se mezclan a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína es $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajusta a $8,0 \pm 0,1$ con solución NaOH 1 M. La reacción de conjugación se permite que proceda a 5 ± 3 °C durante 20 ± 2 horas.

Tapado de grupos funcionales reactivos residuales

Los restos bromoacetilados que no han reaccionado sobre la proteína de vehículo se inactivan mediante la reacción con 2 eq. mol. de hidrocloreuro de N-acetil-L-cisteína como un reactivo de tapado durante 3 horas a 5 ± 3 °C. Los grupos residuales de sulfhidrilo libres se tapan con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ± 3 °C.

5 Purificación de glucoconjugado enlazado a oxo-eTAC

La mezcla de reacción de conjugación (tapada con post-IAA) se filtra a través de un filtro de 0.45 µm. La ultrafiltración/diafiltración del glucoconjugado se realiza frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. El retenido del conjugado después se filtra a través de un filtro de 0,2 µm. Se extrae una alícuota de glucoconjugado para ensayos. El glucoconjugado restante se almacena a 5 ± 3 °C.

10 **Ejemplo 11. Preparación de glucoconjugado enlazado a ((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC) a través de la activación de sacárido y la tiolación con espaciador de dihidrocloreuro de L-cistina dimetiléster**

El sacárido se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución se determina mediante análisis de Karl Fischer (KF) y se ajusta para que alcance un contenido de humedad del 0,1 y 0,4 %, típicamente el 0,2 %.

15 Para iniciar la activación, se prepara recientemente una solución de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activa con diversas cantidades de CDT/CDI (1-10 equivalentes molares) y se permite que proceda la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C. El nivel de activación se puede determinar mediante HPLC. El dihidrocloreuro de L-cistina dimetiléster se prepara recientemente en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. Se hace reaccionar el sacárido activado con 1 - 2 eq. mol. de dihidrocloreuro de L-cistina dimetiléster. Se permite que proceda la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C, para producir un sacárido tiolado. El nivel de tiolación se determina mediante la cantidad añadida de CDT/CDI.

El CDT/CDI residual en la solución de la reacción de activación se inactiva mediante la adición de solución de tetraborato de sodio 100 mM, a pH 9,0. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para ajustar el contenido de humedad final para que sea de hasta el 1-2 % del total acuoso.

25 Purificación del sacárido tiolado activado

A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5 - 10 eq. mol. y se permitió que la reacción procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción después se diluyó 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realiza usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Se extrae una alícuota de retenido de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido en tiol (Ellman).

La conjugación de sacárido tiolado activado con proteína de vehículo bromoacetilada, el tapado y la purificación del conjugado de eTAC siguen el procedimiento general descrito en el ejemplo 10, como anteriormente.

35 **Ejemplo 12. Preparación de glucoconjugado enlazado a ((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC) a través de la activación de sacárido y la tiolación con espaciador de 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol (AEET)**

El sacárido se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución se determina mediante análisis de Karl Fischer (KF) y se ajusta para que alcance un contenido de humedad del 0,1 y 0,4 %, típicamente el 0,2 %.

40 Para iniciar la activación, se prepara recientemente una solución de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activa con diversas cantidades de CDT/CDI (1-10 equivalentes molares) y se permite que proceda la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C. El nivel de activación se puede determinar mediante HPLC. El AEET se prepara recientemente en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. El sacárido activado se hace reaccionar con 1 - 2 eq. mol. de AEET. Se permite que proceda la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C, para producir un sacárido tiolado. El nivel de tiolación se determina mediante la cantidad añadida de CDT/CDI.

El CDT/CDI residual en la solución de la reacción de activación se inactiva mediante la adición de solución de tetraborato de sodio 100 mM, a pH 9,0. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para ajustar el contenido de humedad final para que sea de hasta el 1-2 % del total acuoso.

Purificación del sacárido tiolado activado

50 A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol. y se permitió que la reacción procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción después se diluyó 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realiza usando un diavolumen de

40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Se extrae una alícuota de retenido de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido en tiol (Ellman).

La conjugación de sacárido tiolado activado con proteína de vehículo bromoacetilada, el tapado y la purificación del conjugado de eTAC siguen el procedimiento general descrito en el ejemplo 10, como anteriormente.

5 **Ejemplo 13. Preparación de glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC) a través de la activación de sacárido y la tiolación con espaciador de hidrocloreuro de 4-amino-1-butanotiol**

El sacárido se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución se determina mediante análisis de Karl Fischer (KF) y se ajusta para que alcance un contenido de humedad del 0,1 y 0,4 %, típicamente el 0,2 %.

10 Para iniciar la activación, se prepara recientemente una solución de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activa con diversas cantidades de CDT/CDI (1-10 equivalentes molares) y se permite que proceda la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C. El nivel de activación se puede determinar mediante HPLC. El hidrocloreuro de 4-amino-1-butanotiol se prepara recientemente en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. El sacárido activado se hace reaccionar con 1 - 2 eq. mol. de hidrocloreuro de 4-amino-1-butanotiol. Se permite que proceda la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C, para producir un sacárido tiolado. El nivel de tiolación se determina mediante la cantidad añadida de CDT/CDI.

El CDT/CDI residual en la solución de la reacción de activación se inactiva mediante la adición de una solución de tetraborato de sodio 100 mM, a pH 9,0. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para ajustar el contenido de humedad final para que sea de hasta el 1-2 % del total acuoso.

20 Purificación del sacárido tiolado activado

A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol. y se permitió que la reacción procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción después se diluyó 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realiza usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Se extrae una alícuota de retenido de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido en tiol (Ellman).

La conjugación de sacárido tiolado activado con proteína de vehículo bromoacetilada, el tapado y la purificación del conjugado de eTAC siguen el procedimiento general descrito en el ejemplo 10, como anteriormente.

Ejemplo 14. Preparación de conjugados de Pn-33F oxo-eTAC usando mercaptopropionilhidrazida (MPH)

30 Procedimiento de activación

Activación de polisacárido Pn33F con espaciador de mercaptopropionilhidrazida (MPH)

El polisacárido Pn-33F se combina con 500 mM de 1,2,4,-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congela en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofiliza hasta la sequedad. El polisacárido 33F liofilizado se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido en humedad de la solución de 33F liofilizado/DMSO se determina mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajusta añadiendo WFI a la solución de 33F/DMSO hasta alcanzar un contenido de humedad del 0,2 %.

Para iniciar la activación, el 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) se prepara recientemente como 100 mg/ml en solución de DMSO. El polisacárido Pn33F se activa con diversas cantidades de CDT antes de la etapa de tiolación. La activación de CDT se lleva a cabo a 23 ± 2 °C durante 1 hora. El nivel de activación se determina mediante HPLC (A220/A205). Se añade una solución de tetraborato de sodio 100 mM a pH 9,0 para inactivar cualquier CDT residual en la solución de reacción de activación. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final sea del 1,2 % del total acuoso. Se permite que proceda la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C.

45 Tiolación de polisacárido Pn-33F activado

Se prepara recientemente la MPH en DMSO anhidro y se añade 1 - 2 eq. mol. de MPH a la solución de reacción de polisacárido activado. Se permite que proceda la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C. A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol. y se permitió que la reacción procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción después se diluyó 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realiza usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3 con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. El retenido de polisacárido 33F tiolado se extrae tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Procedimiento de conjugaciónConjugación del polisacárido Pn33F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

La proteína de vehículo CRM₁₉₇ se activa por separado mediante bromoacetilación, y después se hace reaccionar con el polisacárido Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de la reacción se enfría previamente a 5 ± 3 °C. La CRM₁₉₇ bromoacetilada y el polisacárido 33F tiolado se mezclaron juntos en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína es $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajusta a 8,0 - 9,0. La reacción de conjugación se permite que proceda a 5 ± 3 °C durante 20 ± 2 horas.

Tapado de los grupos reactivos en CRM₁₉₇ bromoacetilada y en polisacárido Pn33F tiolado

Los restos bromoacetilados sin reaccionar sobre las proteínas CRM₁₉₇ se taparon haciéndolos reaccionar con 2 eq. mol. de hidrócloruro de N-acetil-L-cisteína durante 3 horas a 5 ± 3 °C, seguido por un tapado de cualquiera de los grupos sulfhidrilo libres residuales del polisacárido 33F tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ± 3 °C.

Purificación de glucoconjugado de Pn-33F enlazado a oxo-eTAC

La solución de conjugación se filtra a través de un filtro de 0,45 µm o de 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se lleva a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 300K. La diafiltración se realiza frente a succinato 5 mM solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. Después se filtra el retenido de 300K del glucoconjugado Pn-33F a través de un filtro de 0,22 µm y se almacena a 5 ± 3 °C.

Ejemplo 15. Preparación de conjugados de Pn-33F oxo-eTAC usando L-Cistina dimetilésterProcedimiento de activaciónActivación de polisacárido Pn33F con espaciador de dihidrocloruro de L-cistina dimetiléster

El polisacárido Pn-33F se combinó con 500 mM de 1,2,4,-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congeló en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofilizó hasta la sequedad. El polisacárido 33F liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido en humedad de la solución de 33F liofilizado/DMSO se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajustó añadiendo WFI a la solución de 33F/DMSO hasta alcanzar un contenido de humedad del 0,2 %.

Para iniciar la activación, el 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) se preparó recientemente como 100 mg/ml en solución de DMSO. El polisacárido Pn33F se activó con diversas cantidades de CDT antes de la etapa de tiolación. La activación de CDT se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 1 hora. El nivel de activación se determinó mediante HPLC (A220/A205). Se añadió una solución de tetraborato de sodio 100 mM a pH 9,0 para inactivar cualquier CDT residual en la solución de reacción de activación. Se realizaron los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final sea del 1,2 % del total acuoso. Se permitió que procediese la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C.

Tiolación de polisacárido Pn-33F activado

Se preparó recientemente el dihidrocloruro de L-cistina dimetiléster en DMSO anhidro y se añadió 1 eq. mol. de dihidrocloruro de L-cistina dimetiléster a la solución de reacción de polisacárido activado. Se permitió que la reacción procediese durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C. La solución de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La solución de reacción diluida se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K, usando agua para inyección (WFI, del inglés, *Water for Injection*).

Reducción y purificación del polisacárido Pn-33F tiolado activado

Al retenido se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), de 5 eq. mol., tras la dilución al 10 % de volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Se permitió que procediese esta reacción de reducción durante 2 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La diafiltración del polisacárido 33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. La diafiltración se realizó frente a fosfato de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. El retenido de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Reducción y purificación alternativa del polisacárido Pn-33F tiolado activado

Como alternativa al procedimiento de purificación descrito anteriormente, el sacárido 33F tiolado activado también se purificó como sigue.

5 A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), de 5 eq. mol., y se permitió que procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción se diluyó después 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3 con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. El retenido de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Procedimiento de conjugación

Conjugación del polisacárido Pn33F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

10 La proteína de vehículo CRM₁₉₇ se activó por separado mediante bromoacetilación, y después se hizo reaccionar con el polisacárido Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de la reacción se enfrió previamente a 5 ± 3 °C. La CRM₁₉₇ bromoacetilada y el polisacárido 33F tiolado se mezclaron juntos en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína fue $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajustó a 8,0 - 9,0. Se permitió que procediese la
15 reacción de conjugación a 5 ± 3 °C durante 20 ± 2 horas.

Tapado de los grupos reactivos en CRM₁₉₇ bromoacetilada y en polisacárido Pn33F tiolado

20 Los restos bromoacetilados sin reaccionar sobre las proteínas CRM₁₉₇ se taparon haciéndolos reaccionar con 2 eq. mol. de hidrocloreto de cisteamina durante 3 horas a 5 ± 3 °C, seguido por un tapado de cualquiera de los grupos sulfhidrido libres residuales del polisacárido 33F tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ± 3 °C.

Purificación de glucoconjugado de Pn-33F enlazado a oxo-eTAC

25 La solución de conjugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm o de 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 300K. La diafiltración se realizó frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. Después se filtró el retenido de 300K del glucoconjugado Pn-33F a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 5 ± 3 °C.

Resultados

Los datos de la caracterización y del procedimiento para los conjugados representativos de Pn-33F oxo-eTAC usando el espaciador dihidrocloreto de L-cistina dimetiléster se proporcionan en la **Tabla 16**.

Ejemplo 16. Preparación de conjugados de Pn-33F oxo-eTAC usando 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol (AEET)

30 Procedimiento de activación

Activación del polisacárido Pn33F con espaciador 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol (AEET)

35 El polisacárido Pn-33F se combinó con 500 mM de 1,2,4-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congeló en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofilizó hasta la sequedad. El polisacárido 33F liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido en humedad de la solución de 33F liofilizado/DMSO se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajustó añadiendo WFI a la solución de 33F/DMSO hasta alcanzar un contenido de humedad del 0,2 %.

40 Para iniciar la activación, el 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) se preparó recientemente como 100 mg/ml en solución de DMSO. El polisacárido Pn33F se activó con diversas cantidades de CDT antes de la etapa de tiolación. La activación de CDT se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 1 hora. El nivel de activación se determina mediante HPLC (A220/A205). Se añadió una solución de tetraborato de sodio 100 mM a pH 9,0 para inactivar cualquier CDT residual en la solución de reacción de activación. Se realizaron los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final sea del 1,2 % del total acuoso. Se permitió que procediese la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C.

45 Tiolación de polisacárido Pn-33F activado

50 Se preparó recientemente el AEET en DMSO anhidro y se añadió 1 - 2 eq. mol. de AEET a la solución de reacción de polisacárido activado. Se permitió que procediese la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C. A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol. y se permitió que la reacción procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción después se diluyó 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3 con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. El retenido de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para la concentración de sacárido como para los

ensayos de tior (Ellman).

Procedimiento de conjugación

Conjugación del polisacárido Pn33F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

5 La proteína de vehículo CRM₁₉₇ se activó por separado mediante bromoacetilación, y después se hizo reaccionar con el polisacárido Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de la reacción se enfrió previamente a 5 ± 3 °C. La CRM₁₉₇ bromoacetilada y el polisacárido 33F tiolado se mezclaron juntos en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína fue $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajusta a 8,0 - 9,0. Se permitió que procediese la reacción de conjugación a 5 ± 3 °C durante 20 ± 2 horas.

10 Tapado de los grupos reactivos en CRM₁₉₇ bromoacetilada y en polisacárido Pn33F tiolado

Los restos bromoacetilados sin reaccionar sobre las proteínas CRM₁₉₇ se taparon haciéndolos reaccionar con 2 eq. mol. de hidrocioruro de N-acetil-L-cisteína durante 3 horas a 5 ± 3 °C, seguido por un tapado de cualquiera de los grupos sulfhidrilo libres residuales del polisacárido 33F tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ± 3 °C.

15 Purificación de glucoconjugado de Pn-33F enlazado a oxo-eTAC

La solución de conjugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm o de 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 300K. La diafiltración se realizó frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. Después se filtró el retenido de 300K del glucoconjugado Pn-33F a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 5 ± 3 °C.

20 Resultados

Los datos de la caracterización y del procedimiento para los conjugados representativos de Pn-33F oxo-eTAC usando el espaciador 2-(2-aminoeto)etano-1-tior (AEET) se proporcionan en la **Tabla 16**.

Ejemplo 17. Preparación de conjugados de Pn-33F oxo-eTAC usando 4-Amino-1-butanotior (ABT)

Procedimiento de activación

25 Activación del polisacárido Pn33F con espaciador de hidrocioruro de 4-Amino-1-butanotior

El polisacárido Pn-33F se combinó con 500 mM de 1,2,4-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congeló en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofilizó hasta la sequedad. El polisacárido 33F liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido en humedad de la solución de 33F liofilizado/DMSO se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajustó añadiendo WFI a la solución de 33F/DMSO hasta alcanzar un contenido de humedad del 0,2 %.

35 Para iniciar la activación, el 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) se preparó recientemente como 100 mg/ml en solución de DMSO. El polisacárido Pn33F se activó con diversas cantidades de CDT antes de la etapa de tiolación. La activación de CDT se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 1 hora. El nivel de activación se determinó mediante HPLC (A220/A205). Se añadió una solución de tetraborato de sodio 100 mM a pH 9,0 para inactivar cualquier CDT residual en la solución de reacción de activación. Se realizaron los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final sea del 1,2 % del total acuoso. Se permitió que procediese la reacción durante 1 hora a 23 ± 2 °C.

Tiolación de polisacárido Pn-33F activado

40 Se preparó recientemente el hidrocioruro de 4-amino-1-butanotior en DMSO anhidro y se añadió 1 - 2 eq. mol. de hidrocioruro de 4-amino-1-butanotior a la solución de reacción de polisacárido activado. Se permitió que procediese la reacción durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C. A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol. y se permitió que la reacción procediese durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción después se diluyó 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3 con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. El retenido de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tior (Ellman).

Procedimiento de conjugación

50 Conjugación del polisacárido Pn33F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

La proteína de vehículo CRM₁₉₇ se activó por separado mediante bromoacetilación, y después se hizo reaccionar con el polisacárido Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de la reacción se enfrió previamente a 5 ± 3 °C. La CRM₁₉₇ bromoacetilada y el polisacárido 33F tiolado se mezclaron juntos en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína es $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajustó a 8,0 - 9,0. Se permitió que procediese la reacción de conjugación a 5 ± 3 °C durante 20 ± 2 horas.

Tapado de los grupos reactivos en CRM₁₉₇ bromoacetilada y en polisacárido Pn33F tiolado

Los restos bromoacetilados sin reaccionar sobre las proteínas CRM₁₉₇ se taparon haciéndolos reaccionar con 2 eq. mol. de hidrocloreuro de N-acetil-L-cisteína durante 3 horas a 5 ± 3 °C, seguido por un tapado de cualquiera de los grupos sulfhidrilo libres residuales del polisacárido 33F tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ± 3 °C.

Purificación de glucoconjugado de Pn-33F enlazado a oxo-eTAC

La solución de conjugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm o de 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 300K. La diafiltración se realizó frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. Después se filtró el retenido de 300K del glucoconjugado Pn-33F a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 5 ± 3 °C.

Resultados

Los datos de la caracterización y del procedimiento para los conjugados representativos de Pn-33F oxo-eTAC usando el espaciador hidrocloreuro de 4-amino-1-butanotiol (ABT) se proporcionan en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados de Pn33F eTAC con diversos tipos de enlazadores

Lote del conjugado	Pn-33F-eTAC-AEET (véase el ejemplo 16)	Pn-33F-eTAC-Cistina (véase el ejemplo 15)	Pn-33F-eTAC-ABT (véase el ejemplo 17)
Pm del polisacárido (SEC-MALLS)	1565 kDa	1565 kDa	1565 kDa
Activación del poli.			
Meq. de CDT	3	3	3
Enlazador	AEET	Cistina	ABT
MEq. de enlazador	1	1	1
MEq. de TCEP	5 meq	5 meq	5 meq
Producción	80 %	84 %	75 %
Contenido de tiol (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,19	0,033	0,18
Conjugación con CRM₁₉₇			
Proporción de entrada	0,80	0,80	0,80
Resultados del conjugado			
Producción de sacáridos (%)	55 %	52 %	52 %
Proporción de sacárido/proteína	1,6	2,1	2,6
Sacárido libre	8 %	7 %	7 %
Proteína libre	< 1 %	< 1 %	< 1 %
Pm del conjugado (SEC-MALLS)	4518 kDa	4369 kDa	3616 kDa

Los conjugados polisacárido-proteína se generaron con cada uno de estos enlazadores que tienen atributos de buena calidad, incluyendo el peso molecular, alto rendimiento, bajos niveles de sacárido libre y bajos niveles de proteínas.

Ejemplo 18. Procedimiento general para la preparación de glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)amina (oxo-eTAAN) mediante oxidación de hidroxilo primario

Oxidación de los grupos hidroxilo primarios del polisacárido

La oxidación de los alcoholes primarios en el polisacárido se logró usando el sistema TEMPO/NCS bien en disolvente acuoso u orgánico. Los polisacáridos se oxidaron hasta grados de oxidación (GO) variables mediante el ajuste de la cantidad de cooxidante de NCS. Generalmente se usaron 0,5 - 2,5 equivalentes molares de NCS para lograr el grado de oxidación diana. La reacción de oxidación normalmente se hizo en tampón bicarbonato/carbonato

(tampón de NaHCO_3 0,5 M / Na_2CO_3 0,05 M, a pH 8,6) o tampones de fosfato de sodio de pH 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0 y se completa en 2 horas. En algunos experimentos de activación se usó un alcohol primario tal como n-propanol para inactivar los reactivos con el fin de evitar la sobreoxidación del sacárido.

5 En un ejemplo específico, se añadió el polisacárido de serotipo 33F a un recipiente de reacción a una concentración de 4,0 mg/ml y se mezcló con tampón bicarbonato/carbonato (tampón de NaHCO_3 0,5 M / Na_2CO_3 0,05 M, a pH 8,6) en una proporción de 1:1 v/v. A la mezcla agitada se le añadieron $\leq 0,1$ equivalentes molares de TEMPO. La reacción se inició mediante la adición de 0,6 a 1,0 equivalentes molares de N-clorosuccinimida (NCS). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se purificó el polisacárido mediante diafiltración, con WFI usando una membrana de ultrafiltración de 30K. Se recolectó el polisacárido purificado y se
10 determinó el grado de oxidación (GO) mediante mediciones cuantitativas de aldehído (usando un ensayo de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH)) y polisacárido (usando un ensayo de antrona).

Tiolación de polisacárido oxidado usando la química de la aminación reductiva

Activación usando el espaciador 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol (AEET) (3ª columna de la Tabla 17)

15 El polisacárido de serotipo 33F oxidado y purificado se añadió al recipiente de reacción tras la adición de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (a pH 6,5) hasta una concentración final de tampón de 0,1 M. A esta solución, se le añadió 1 Meq de 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$) (AEET) y se mezcló a conciencia con el fin de obtener una solución homogénea. Se ajustó el pH a 6,8 usando una solución de HCl diluido o de 1N NaOH. A esto le siguió la adición de 1,5 equivalentes molares de NaCNBH_3 . La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente (23 °C). Después se diluyó la mezcla de reacción con solución salina IX al 0,9 % y los grupos
20 aldehído que no han reaccionado se "taparon" con 2 equivalentes molares de borohidruro de sodio. El borohidruro de sodio también funciona como un agente reductor para la reducción de cualquier disulfuro formado durante la reacción. El tiempo de la reacción de tapado fue típicamente 3 horas.

Activación usando espaciador de cistamina (2ª columna de la Tabla 17)

25 El polisacárido de serotipo 33F oxidado y purificado se añadió al recipiente de reacción tras la adición de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (a pH 6,5) hasta una concentración final de tampón de 0,1 M. A esta solución, se añadió 1 MEq de solución de dihidrocloruro de cistamina y se mezcló a conciencia con el fin de obtener una solución homogénea. Se ajustó el pH a 6,8 usando una solución de HCl diluido o de 1N NaOH. A esto le siguió la adición de 1,5 equivalentes molares de NaCNBH_3 . La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente (23 °C). Como alternativa, se hizo reaccionar el sacárido activado con 1 MEq de hidrocloreuro de cisteamina.
30 Después se diluyó la mezcla de reacción con solución salina IX al 0,9 % y los grupos aldehído que no han reaccionado se "taparon" con 2 equivalentes molares de borohidruro de sodio. El borohidruro de sodio también funciona como un agente reductor para la reducción de cualquier disulfuro formado durante la reacción. El tiempo de la reacción de tapado fue típicamente 3 horas.

Purificación del sacárido tiolado activado

35 Cualquiera de los enlaces disulfuro restantes presentes en el sacárido se redujo usando un agente reductor adecuado tal como (2-carboxietil)fosfina (TCEP) o ditioeritritol (DTT). La mezcla de reacción de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición a succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 μm . La diafiltración del sacárido tiolado se realizó frente a un diavolumen de WFI de 40 veces. Al retenido se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), de 1 - 5 eq. mol., tras la dilución al 10 % de volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Se permitió que esta reacción de
40 reducción procediese durante 20 ± 2 horas a 5 ± 3 °C. La purificación del sacárido tiolado activado se realizó preferentemente mediante ultrafiltración/diafiltración de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Como alternativa, el sacárido tiolado se purificó mediante procedimientos convencionales cromatográficos de exclusión por tamaño (SEC) o procedimientos de cromatografía de intercambio iónico. Se extrajo una alícuota de retenido de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido en tiol (Ellman).
45

En otro ejemplo, se usan sacáridos de bajo peso molecular para hacerlos reaccionar con el reactivo de aminotiol utilizando el extremo reductor de la cadena del sacárido. Los sacáridos de bajo peso molecular se preparan mediante hidrólisis química u homogeneización mecánica de polisacáridos de alto peso molecular.

Conjugación de 33F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

50 Antes de comenzar la reacción de conjugación, los recipientes de reacción se enfriaron previamente a 5 ± 3 °C. La proteína de vehículo bromoacetilada y el sacárido tiolado activado se añadió posteriormente y se mezcló a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La proporción de entrada de sacárido/proteína fue $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajustó a $8,0 \pm 0,1$ con solución de NaOH 1 M. Se permitió que procediese la reacción de conjugación a 5 °C durante 20 ± 2 horas. Los restos bromoacetilados que no han reaccionado sobre la proteína de vehículo se
55 inactivaron mediante la reacción con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína como un reactivo de tapado durante 3 horas a 5 ± 3 °C. Los grupos residuales de sulfhidrilo libres se taparon con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ± 3 °C.

La mezcla de reacción de la conjugación (post-IAA-tapado) se filtró a través de un filtro de 5 µm y después se purificó usando membranas de ultrafiltración de CPM de 100K frente a succinato 5 mM-solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. El conjugado purificado se filtró después a través de filtros de 0,45/0,22 µm para obtener el conjugado en masa.

Resultados

- 5 Los datos de la caracterización y del procedimiento para los conjugados representativos de Pn-33F eTAAN usando 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol (AEET) o cistamina como espaciador y conjugado con **CRM₁₉₇** se proporcionan en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Parámetros experimentales y datos de caracterización para los conjugados de Pn-33F eTAAN

Lote del conjugado	Pn-33F-eTAAN- TEMPO- Cistamina	Pn-33F-eTAAN- TEMPO- AEET
Pm del polisacárido (SEC-MALLS)	1565 kDa	1565 kDa
Oxidación de poli.		
TEMPO (% en v/v)	1	1
NCS (eq. mol.)	0,6	0,6
Producción	68 %	68 %
Pm del poli. oxidado (SEC-MALLS)	217 kDa	217 kDa
Grado de oxidación	10	10
Tiolación		
Enlazador	Cistamina	AEET
NaCNBH3 (eq. mol.)	1,5	1,5
Producción	19 %	33 %
Contenido de tiol (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,09	0,09
Conjugación con CRM₁₉₇		
Proporción de entrada (SPR)	0,8	0,8
Resultados del conjugado		
Producción de sacáridos (%)	89 %	80 %
Proporción de sacárido/proteína	0,96	0,85
Sacárido libre	22 %	13 %
Pm del conjugado (SEC-MALLS)	331 kDa	512 kDa

- 10 Los conjugados polisacárido-proteína se generaron con cada uno de estos enlazadores que tienen atributos de buena calidad, incluyendo el peso molecular, alto rendimiento, bajos niveles de sacárido libre.

Ejemplo 19. Procedimiento general para la preparación de glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tiol)alquil)amina (oxo-eTAAN) mediante oxidación de dioles adyacentes del polisacárido

- 15 Como alternativa, los sacáridos se pueden activar oxidando los dioles cis adyacentes usando peryodato. En un ejemplo específico, el polisacárido de serotipo 33F se disolvió en tampón de fosfato de sodio 100 mM (a pH 6,0) hasta una concentración final de 2 mg/ml en tampón 25 mM. La reacción se inició mediante la adición de 0,2 Meq de peryodato de sodio (50 mg/ml de solución en agua). Después de 18 horas se purificó el polisacárido mediante diafiltración, con WFI usando una membrana de ultrafiltración de 30K. Se recolectó el polisacárido purificado y se determinó el grado de oxidación (GO) mediante mediciones cuantitativas de aldehído (usando un ensayo de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH)) y polisacárido (usando un ensayo de antrona).

- 20 La tiolación del polisacárido oxidado y la conjugación se llevaron a cabo mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 18 tal como se describe anteriormente.

Resultados

- 25 Los datos de la caracterización y del procedimiento para los glucoconjugados representativos de Pn-33F eTAAN usando 2-(2-aminoetoxi)etano-1-tiol (AEET) o cistamina como espaciador y conjugado con **CRM₁₉₇** se proporcionan en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Parámetros experimentales y datos de caracterización para los conjugados de Pn-33F eTAAN

Lote del conjugado	Pn-33F-eTAAN- NaIO ₄ -Cistamina	Pn-33F-eTAAN- NaIO ₄ -AEET
Pm del polisacárido (SEC-MALLS)	1565 kDa	1565 kDa
Oxidación de poli.		
NaIO ₄ (eq. mol.)	0,14	0,14
Producción	69 %	69 %
Grado de oxidación	12	12
Tiolación		
Enlazador	Cistamina	AEET
NaCNBH ₃ (eq. mol.)	1,5	1,5
Producción	100 %	100 %
Contenido de tiol (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,06	0,06
Conjugación con CRM197		
Proporción de entrada (SPR)	0,8	0,8
Resultados del conjugado		
Producción de sacáridos (%)	56 %	59 %
Proporción de salida (SPR)	1,9	2,2
Sacárido libre	< 5 %	< 5 %
Proteína libre	< 1 %	< 1 %
Pm del conjugado (SEC-MALLS)	6324 kDa	5890 kDa

Los conjugados polisacárido-proteína se generaron con cada uno de estos enlazadores que tienen atributos de buena calidad, incluyendo el peso molecular, alto rendimiento, bajos niveles de sacárido libre y bajos niveles de proteínas.

Ejemplo 20. Procedimiento para la preparación de glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)amida (oxo-eTAAD)

El polisacárido Pn-22F se combina con 500 mM de 1,2,4,-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congela en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofiliza hasta la sequedad. El polisacárido Pn-22F liofilizado se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. A esta solución, se le añade hidrocloreuro de cistamina (1,0 meq), seguido de hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,1 meq) y HOBt (1,1 meq). Después se agita la mezcla durante 18 ± 2 horas a 23 ± 2 °C antes de que se diluya 10 veces vertiendo en el tampón de fosfato de sodio previamente enfriado, a pH 6,0. La solución diluida se filtra a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-22F derivatizado se lleva a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K, frente a agua para inyección (WFI). Se recolecta el retenido.

Reducción y purificación del polisacárido Pn-22F tiolado activado

Al retenido se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5 eq. mol.), tras la dilución al 10 % de volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Se permite que proceda esta reacción de reducción durante 2 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La diafiltración del polisacárido Pn-22F tiolado se lleva a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. La diafiltración se realiza frente a fosfato de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. El retenido de polisacárido Pn-22F tiolado se extrae tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Conjugación del polisacárido Pn-22F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

La proteína de vehículo CRM₁₉₇ se activa por separado mediante bromoacetilación, como se describe en el **Ejemplo 1**, y después se hizo reaccionar con el polisacárido Pn-22F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de la reacción se enfría previamente a 5 ± 3 °C. La CRM₁₉₇ bromoacetilada y el polisacárido Pn-22F tiolado se mezclan juntos en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm, usando una proporción de entrada de sacárido/proteína de $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajusta a 8,0 - 9,0. La reacción de conjugación se permite que proceda a 5 ± 3 °C durante 20 ± 2 horas.

Tapado de los grupos reactivos en CRM₁₉₇ bromoacetilada y en polisacárido Pn-22F tiolado

Los restos bromoacetilados sin reaccionar sobre las proteínas CRM₁₉₇ se tapan haciéndolos reaccionar con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína durante 3 horas a 5 ± 3 °C, seguido por un tapado de cualquiera de los grupos sulfhidrilo libres residuales del polisacárido Pn8 tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ± 3 °C.

Purificación del glucoconjugado Pn-22F enlazado a eTAAD

5 La solución de conjugación se filtra a través de un filtro de 0,45 μm o de 5 μm . La diafiltración del glucoconjugado Pn-22F se lleva a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. La diafiltración se realiza frente a succinato 5 mM solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. Después se filtra el retenido de 100K del glucoconjugado Pn-22F a través de un filtro de 0,22 μm y se almacena a 5 ± 3 °C.

Ejemplo 21. Procedimiento para la preparación de glucoconjugado enlazado a (((2-oxoetil)tio)alquil)amida (oxo-eTAAD) a través de una vía de activación de tiazolidinonaDerivatización del polisacárido Pn-22F

10 El polisacárido Pn-22F se combina con 500 mM de 1,2,4,-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congela en el recipiente en baño de hielo seco-etanol y después se liofiliza hasta la sequedad. El polisacárido Pn-22F liofilizado se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. A esta solución, se le añaden las soluciones de tiazolidina-2-tiona (TT) (0,3 MEq) e hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,3 meq). Después se agita la mezcla durante 18 ± 2 horas a 23 ± 2 °C. A esta solución se le añaden 0,2 MEq de hidrocloreuro de cistamina y la reacción continúa durante otras 18 horas. Al polisacárido tiolado se le intercambia el tampón con agua.

15

Al retenido se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5 eq. mol.), tras la dilución al 10 % de volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Se permite que proceda esta reacción de reducción durante 2 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La diafiltración del polisacárido Pn8 tiolado se lleva a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro de CPM de 100K. La diafiltración se realiza frente a fosfato de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3.

20 El retenido de polisacárido Pn-22F tiolado se extrae tanto para la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Conjugación del polisacárido Pn-22F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

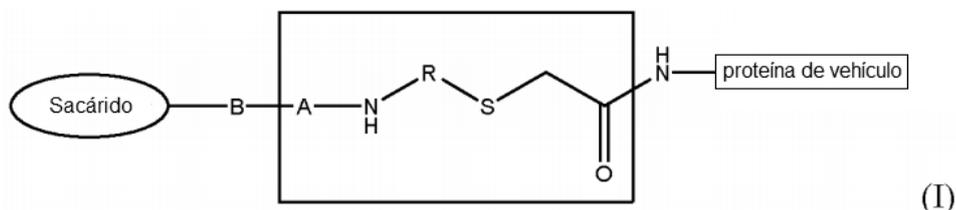
La conjugación del polisacárido Pn-22F tiolado se lleva a cabo tal como se describe en el Ejemplo 20 anterior.

25 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, ciertos cambios y modificaciones se pueden practicar dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) que tiene la fórmula general (I):



5 en la que:

A es un grupo (C=X)_m en el que X es S u O y m es 0 o 1;

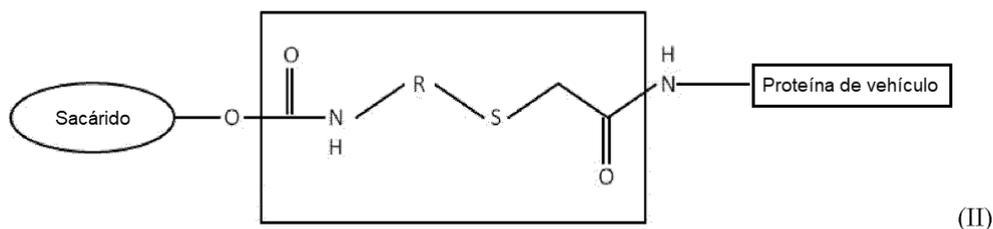
B es un enlace, O o CH₂; y cuando m es 0, B también puede ser (C=O);

R se selecciona de los grupos que consisten en (CH₂)₂, (CH₂)₃, (CH₂)₄, (CH₂)₅, (CH₂)₆, (CH₂)₇, (CH₂)₈, (CH₂)₉ o (CH₂)₁₀; o

10 R se selecciona de los grupos que consisten en O-CH₂, O-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂-(N-CH₃)-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-(N-CH₃)-CH₂-CH₂ y CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂;

con la condición de que dicho espaciador no sea el espaciador (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC).

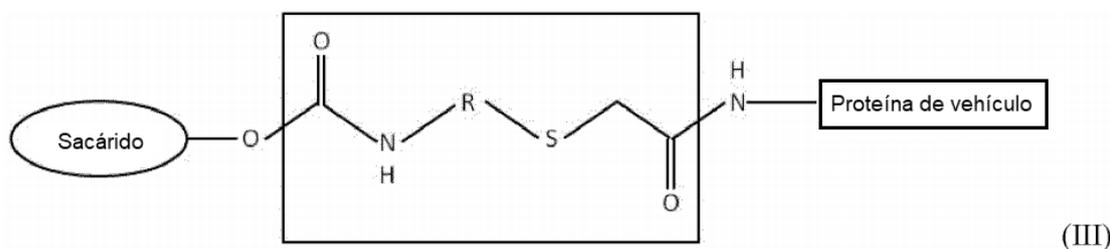
15 2. Un glucoconjugado según la reivindicación 1 que comprende un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) que tiene la fórmula general (II):



en la que R es (CH₂)_n en la que n es 3 a 10.

3. El glucoconjugado de la reivindicación 2 en el que n es 3, 4, 5 o 6.

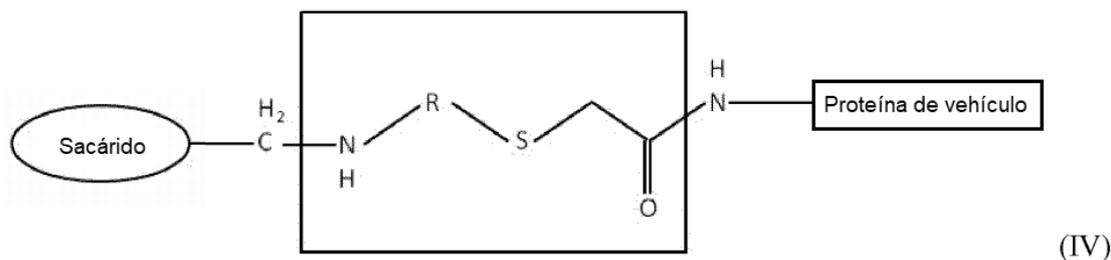
20 4. Un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) que tiene la fórmula general (III):



en la que R es selecciona de (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂, CH(COOH)(CH₂)_n, NHCO(CH₂)_n, NHCO(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂, OCH₂(CH₂)_n o O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂;

en la que n se selecciona de 1 a 10 y m se selecciona de 1 a 4.

25 5. Un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) que tiene la fórmula general (IV):



en la que R se selecciona de $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n$, $\text{NHCO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n$ o $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$; en la que n se selecciona de 1 a 10 y m se selecciona de 1 a 4.

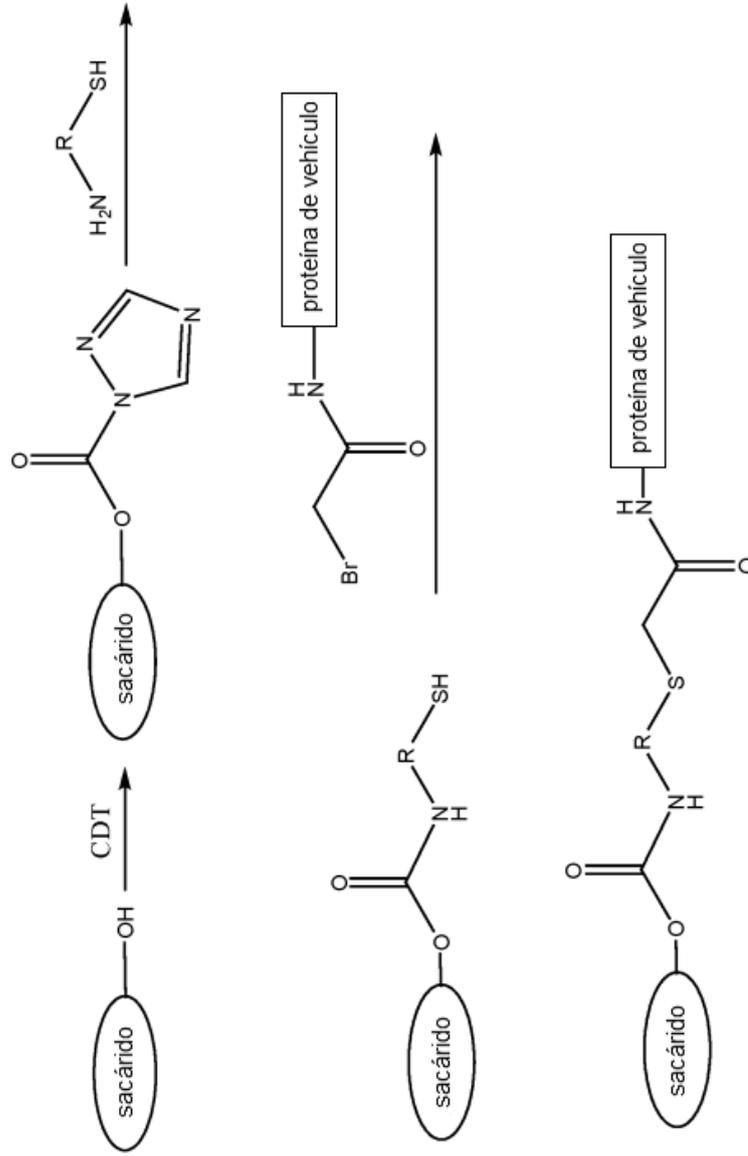
- 5 6. Un glucoconjugado según la reivindicación 1 que comprende un sacárido conjugado covalentemente con una proteína de vehículo a través de un espaciador que contiene ((2-oxoetil)tio) que comprende:
- 10 - un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC), en el que el sacárido se une de manera covalente al espaciador de oxo-eTAC a través de una unión de carbamato, y en el que la proteína de vehículo se une de manera covalente al espaciador oxo-eTAC a través de una unión de tioéter y amida; o
- 10 - un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)amina (oxo-eTAAN), en el que el sacárido se une de manera covalente al espaciador de oxo-eTAAN a través de una unión de amina, y en el que la proteína de vehículo se une de manera covalente al espaciador oxo-eTAAN a través de una unión de tioéter y amida.
- 15 7. El glucoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sacárido es un polisacárido capsular derivado de *S. pneumoniae*.
8. El glucoconjugado de la reivindicación 7, en el que dicho polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de los serotipos de Pn 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 33F y 35B.
- 20 9. El glucoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sacárido es un sacárido capsular derivado de *N. meningitidis*, *Streptococcus Grupo B*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.
- 25 10. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proteína de vehículo se selecciona en el grupo que consiste en TT, DT, mutantes de DT (tales como CRM₁₉₇), proteína D de *H. influenzae*, PhtX, PhtD, fusiones PhtDE, neumolisina detoxificada, PorB, proteína N19, PspA, OMPC, toxina A o B de *C. difficile* y PsaA.
11. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proteína de vehículo es CRM₁₉₇.
12. Una composición inmunogénica que comprende al menos un glucoconjugado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 13. Un procedimiento de fabricación de un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)carbamato (oxo-eTAC), que comprende las etapas de:
- 35 a) hacer reaccionar un sacárido con un derivado de ácido carbónico o derivado de cianógeno, para producir un sacárido activado;
- b) hacer reaccionar el sacárido activado con un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol o una sal del mismo, para producir un sacárido tiolado;
- c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente desprotector o reductor para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres;
- d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y
- 40 e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α -haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado;
- mediante el cual se produce un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAC.
- 45 14. Un procedimiento de fabricación de un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína de vehículo a través de un espaciador (((2-oxoetil)tio)alquil)amina (oxo-eTAAN), que comprende las etapas de:

- 5 a) hacer reaccionar un sacárido con un reactivo oxidante para generar grupos aldehído para producir un sacárido activado;
- b) hacer reaccionar el sacárido activado con un enlazador bifuncional que contiene funciones de amina y de tiol (en formas protegidas o libres) del extremo amino del enlazador, para producir un sacárido tiolado mediante aminación reductiva;
- 10 c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente desprotector o un agente reductor (si el tiol está protegido) para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres;
- d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína de vehículo activada que comprende uno o más grupos α -haloacetamida, para producir un conjugado de sacárido tiolado-proteína de vehículo; y
- 10 e) hacer reaccionar el conjugado de sacárido tiolado-proteína del vehículo con (i) un primer reactivo de tapado capaz de tapar los grupos de α -haloacetamida no conjugados de la proteína de vehículo activada; y/o (ii) un segundo reactivo de tapado capaz de tapar restos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado;

mediante el cual se produce en un glucoconjugado enlazado a oxo-eTAAN.

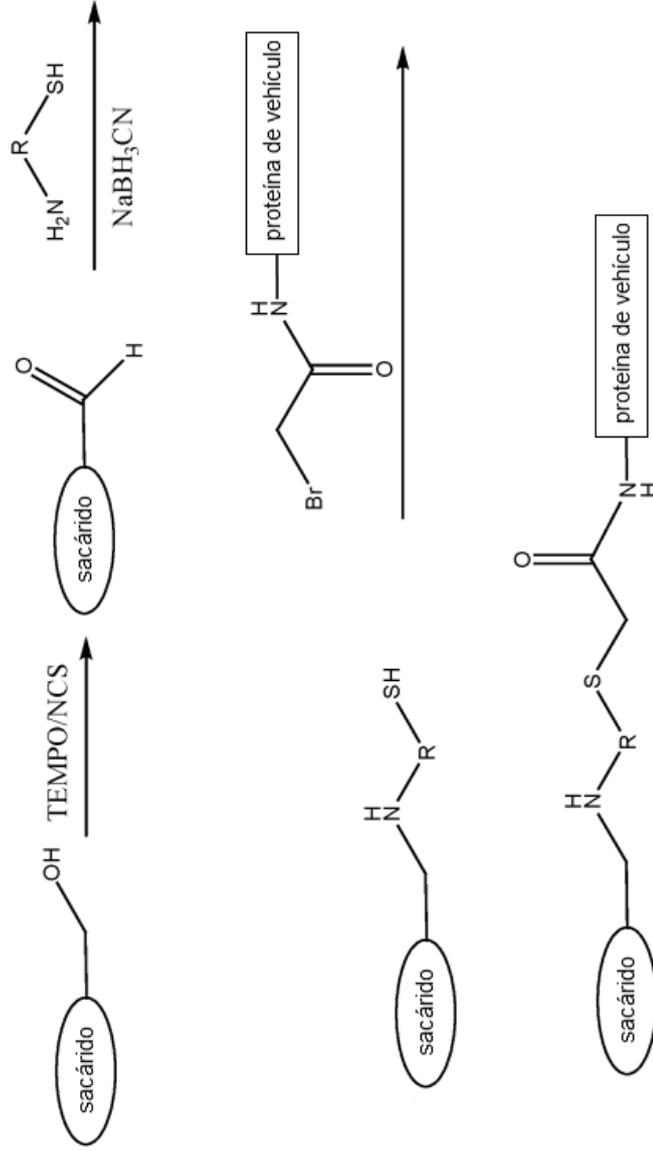
- 15 15. Los glucoconjugados de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición inmunogénica de la reivindicación 12 para su uso como un medicamento.
16. Los glucoconjugados de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición inmunogénica de la reivindicación 12 para su uso como una vacuna.
- 20 17. Los glucoconjugados de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición inmunogénica de la reivindicación 12 para su uso en un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto.

FIGURA 1



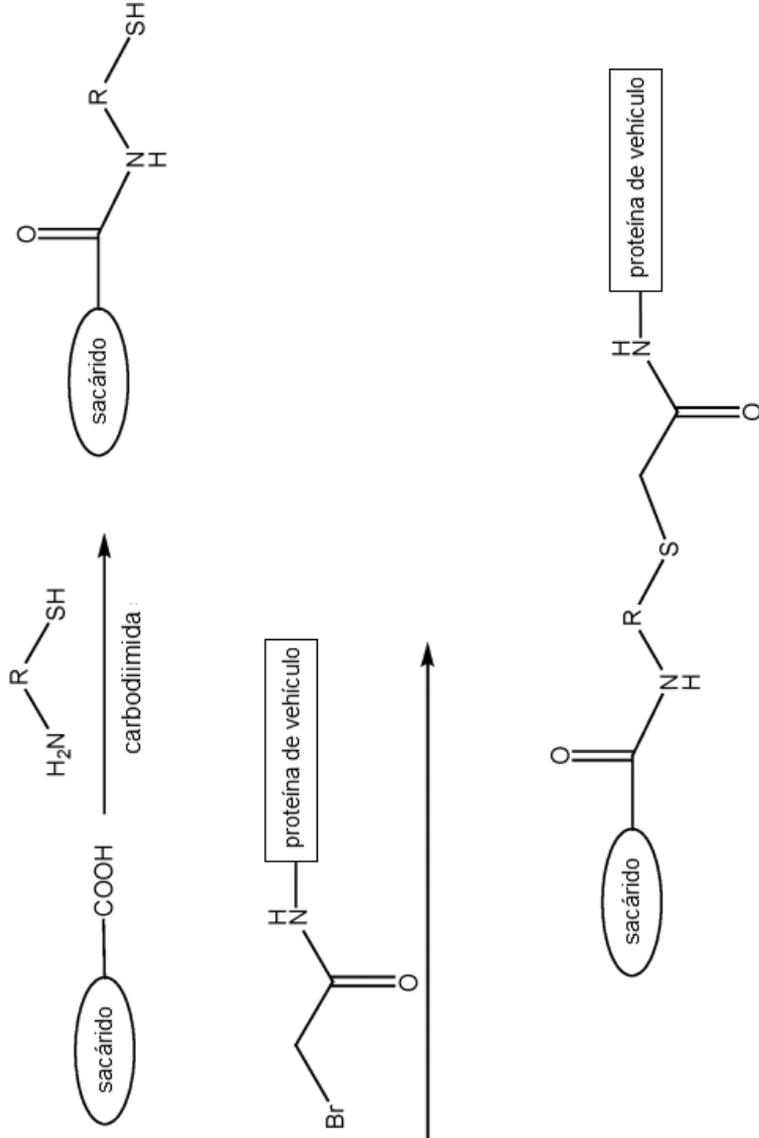
Esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAC (Activación de hidroxilo de ETAC/CDT (eTAC))

FIGURA 2



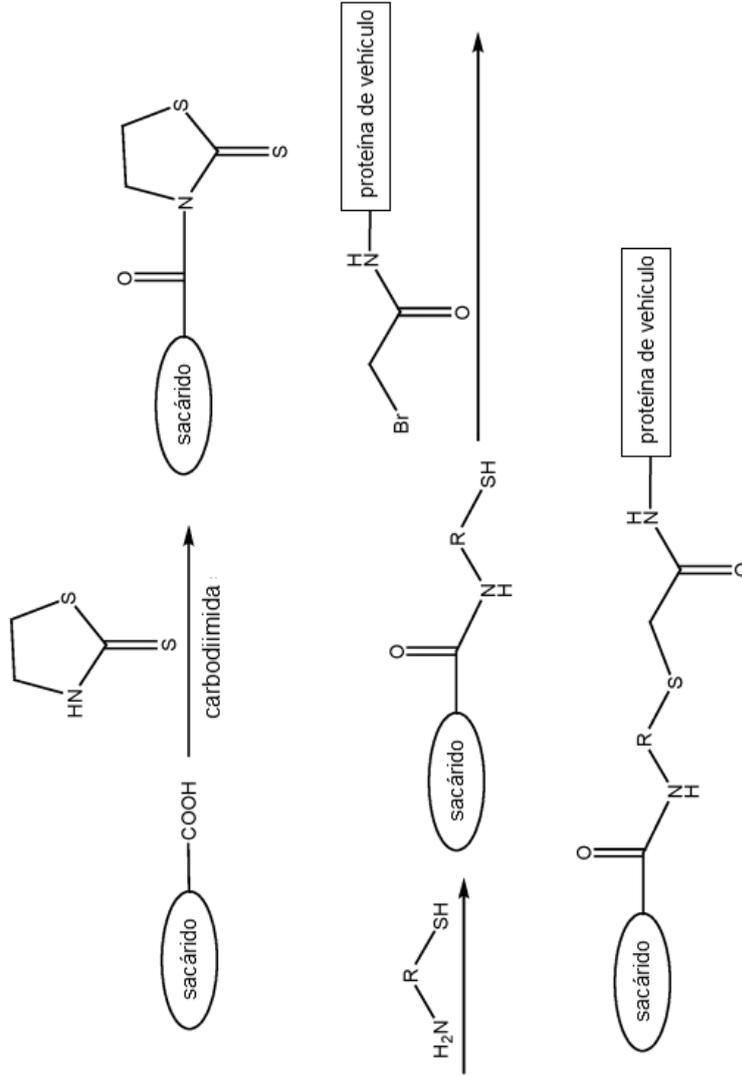
Esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAN

FIGURA 3



Esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAD

FIGURA 4



Esquema general para la preparación de glucoconjugados enlazados a oxo-eTAAD, usando derivados de tiazolidinonona (ETAAD - tiazolidinona)

FIGURA 6

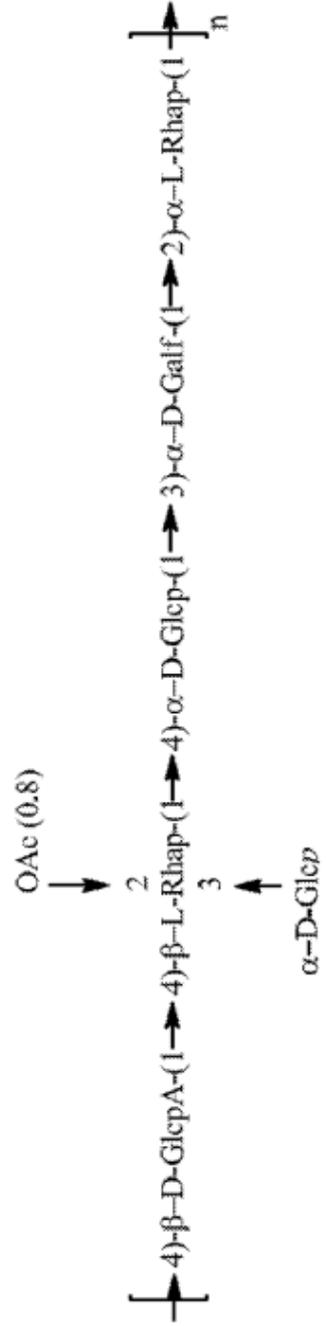
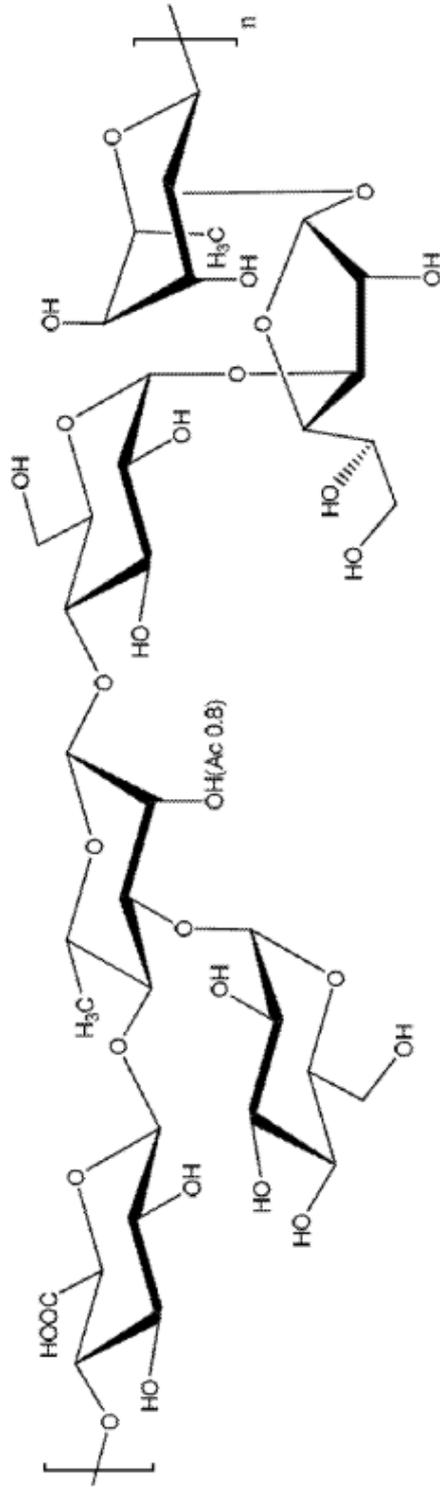


FIGURA 7

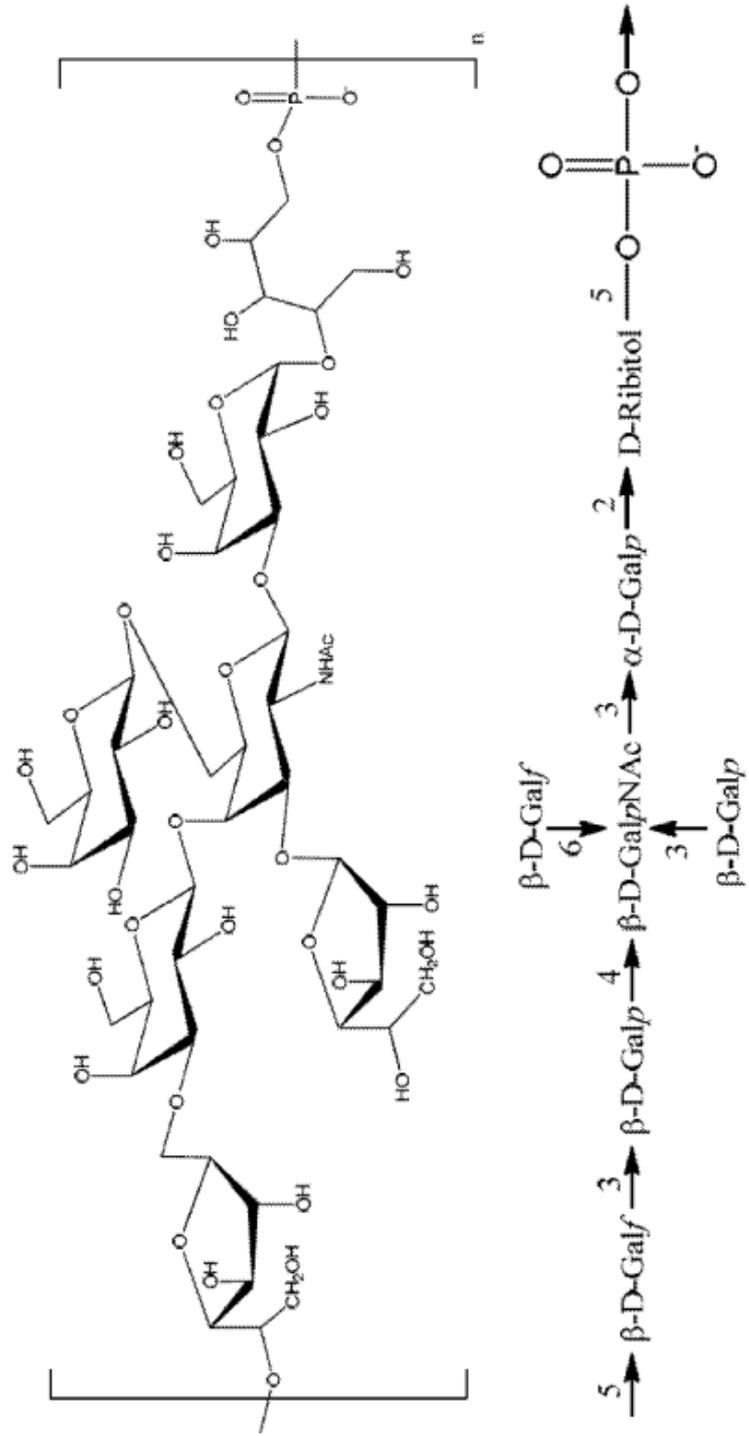


FIGURA 8

