

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 934**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/085** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**A61K 47/64** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2010 PCT/US2010/039473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11041003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2010 E 10803414 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2445523**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para preparar composiciones inmunogénicas de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 de Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

**22.06.2009 US 219143 P**  
**22.06.2009 US 219151 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2019**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)**  
**235 East 42nd Street**  
**New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**FREESE, STEPHEN, JOHN;**  
**ANDERSON, ANNALIESA;**  
**PAVLIAK, VILIAM;**  
**JANSEN, KATHRIN, UTE;**  
**DODGE, INGRID, LEA;**  
**SCOTT, TRACY, DEE;**  
**NANRA, JASDEEP, SINGH;**  
**PRASAD, A., KRISHNA y**  
**GREEN, BRUCE, ARTHUR**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

Observaciones:

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

ES 2 729 934 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

Composiciones y procedimientos para preparar composiciones inmunogénicas de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 de *Staphylococcus aureus*

### Referencia cruzada a las Solicitudes Relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de las Solicitudes de Patente Provisional de los Estados Unidos n.º 61/219.143 y 61/219.151, presentadas el 22 de junio de 2009.

### Campo de la invención

La invención se refiere en general a composiciones inmunogénicas de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 de *Staphylococcus aureus* y a su uso.

### 10 Antecedentes de la invención

Los seres humanos son un reservorio natural para *Staphylococcus aureus* grampositivas. Por ejemplo, *S. aureus* puede colonizar la piel, las fosas nasales y garganta, o bien permanentemente o bien de forma transitoria, sin dar lugar a enfermedad. Las infecciones por *S. aureus* varían entre infecciones de la piel leves y endocarditis, osteomielitis, bacteriemia y septicemia. *S. aureus* también da lugar a una mayoría de infecciones hospitalarias, y su prevalencia en infecciones de aparición en el ámbito extrahospitalario va en aumento. Además, en 2005, las infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) se estimaron en 31,8 cada 100.000 individuos, incluyendo 16.650 muertes en los Estados Unidos en 2005 (Klebens y col. (2007) J. Am. Med. Assoc. 298:1763 a 1771). Posteriormente tiene lugar la enfermedad cuando los individuos se vuelven inmunodeprimidos debido a alteraciones en las barreras inmunitarias, tal como durante la cirugía, colocación de catéteres permanentes u otros dispositivos, traumatismo o heridas.

*S. aureus* produce un gran número de antígenos extra- e intracelulares, incluyendo numerosas toxinas y enzimas. De particular interés en el presente documento son los serotipos de polisacárido capsular de *S. aureus* (véase, Karakawa y Vann, "Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*", en: Weinstein & Fields, eds. *Seminars in Infectious Diseases*. IV. Bacterial Vaccines. (Nueva York, NY; Thieme Stratton; 1982. pág. 285 a 293), especialmente polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8. Estudios epidemiológicos sobre un gran número de cepas de *S. aureus* aisladas a partir de individuos mostraron que de un 70 % a un 80 % fueron o bien polisacárido capsular de serotipo 5 o bien 8 (Arbeit y col. (1984) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:85 a 91). Desafortunadamente, los polisacáridos capsulares son malos inmunógenos por sí mismos. El documento WO2007113223 desvela una composición inmunogénica que comprende PNAG y polisacáridos capsulares tipo 8. El tipo 8 puede conjugarse con una proteína transportadora en particular utilizando la química de conjugación de CDAP o alternativamente no está conjugado. El documento WO2007113222 desvela composición inmunogénica que comprende un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo 5 y/u 8 de *S. aureus* que tiene el 30-100 % de acetilación. El tipo 8 puede conjugarse con una proteína transportadora en particular utilizando la química de conjugación de CDAP o alternativamente no está conjugado.

35 Las infecciones y enfermedades por estafilococos aumentaron dramáticamente en los últimos veinte años, tal como lo ha hecho el uso de dispositivos intravasculares y de procedimientos invasivos. El aumento en la incidencia de enfermedades es más preocupante debido a un aumento paralelo de la resistencia a antibióticos; por lo tanto, hay una necesidad urgente de composiciones inmunogénicas para prevenir infecciones y enfermedades por estafilococos.

### 40 Sumario de la invención

La presente invención se dirige hacia conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de *S. aureus* conjugado con una proteína transportadora, y a procedimientos para fabricar tales conjugados. Los polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de *S. aureus* pueden obtenerse directamente a partir de las bacterias usando unos procedimientos de aislamiento conocidos por los expertos en la técnica, pueden producirse usando protocolos de síntesis, o pueden producirse de forma recombinante usando unos procedimientos de ingeniería genética también conocidos por los expertos en la técnica. Además, la presente divulgación proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria frente a una bacteria de estafilococo, procedimientos para prevenir una enfermedad causada por una bacteria de estafilococo, y procedimientos para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad causada por infección con una bacteria de estafilococo.

La invención comprende un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de *Staphylococcus aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora como se define en las reivindicaciones adjuntas.

55 El polisacárido capsular de serotipo 8 tiene un grado de O-acetilación de entre el 75-100 %. En una realización, el conjugado inmunogénico genera un anticuerpo que es funcional cuando se mide por la destrucción de bacterias o

bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

La proteína transportadora de conjugado inmunogénico es CRM<sub>197</sub> unido covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato y un enlace de amida. En una realización, la proporción molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM<sub>197</sub> puede ser de 10:1 a 25:1. En una realización, el conjugado comprende un enlace covalente entre CRM<sub>197</sub> y polisacárido para al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, el enlace entre la proteína transportadora y el polisacárido está presente una vez cada 5 unidades de repetición del polisacárido.

En una realización, el conjugado inmunogénico que comprende CRM<sub>197</sub> comprende de 5 a 22 lisinas o de 8 a 15 lisinas unidas covalentemente con el polisacárido. En una realización, el conjugado inmunogénico que comprende CRM<sub>197</sub> comprende de 5 a 23 lisinas o de 8 a 12 lisinas unidas covalentemente con el polisacárido.

El conjugado inmunogénico comprende un polisacárido de tipo 8 que está un 75-100 % O-Acetilado. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica puede usarse para generar anticuerpos que son funcionales en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

En una realización, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre de tipo 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 8.

En una realización, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre de tipo 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 8.

En una realización, la invención comprende una composición inmunogénica que comprende un conjugado inmunogénico tal como se describe en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente o transportador.

El adyuvante puede ser un adyuvante basado en aluminio, tal como uno o más de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, el adyuvante comprende fosfato de aluminio.

En una realización, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre de tipo 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 8.

En una realización, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre de tipo 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 8.

Adicionalmente, se desvela un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria a un polisacárido capsular de serotipo 8 de *Staphylococcus aureus* conjugado en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento.

Adicionalmente, se desvela un procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de *Staphylococcus aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora, comprendiendo el procedimiento las etapas de: hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* aislado con 1,1-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT) en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de serotipo 8 activado; y hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 8 activado con una proteína transportadora en un disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 8:proteína transportadora.

En un aspecto, el procedimiento de activación de polisacárido capsular de serotipo 8 de *Staphylococcus aureus* además comprende liofilizar el polisacárido de serotipo 8 aislado y volver a suspender el polisacárido liofilizado en un disolvente orgánico. En un aspecto, el polisacárido vuelto a suspender se activa y a continuación se hace que reaccione directamente con la proteína transportadora. En un aspecto, el polisacárido de serotipo 8 aislado activado se aísla antes de hacer que reaccione con la proteína transportadora. En una realización, el polisacárido de serotipo 8 aislado activado se liofiliza para producir un polisacárido de serotipo 8 aislado activado liofilizado antes de hacer que reaccione el polisacárido con la proteína transportadora. En un aspecto, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína transportadora comprende una etapa de liofilización de la proteína transportadora para producir una proteína transportadora liofilizada antes de hacer que reaccione la proteína transportadora con el polisacárido. En un aspecto, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína transportadora comprende la etapa de volver a suspender el polisacárido de serotipo 8 aislado activado liofilizado y la proteína transportadora liofilizada en un disolvente orgánico como parte de la reacción del polisacárido de serotipo 8 aislado activado con una proteína transportadora.

En un aspecto, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado-proteína transportadora comprende la etapa de dilución de la mezcla de reacción de polisacárido activado y proteína transportadora y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C.

En un aspecto, la mezcla de reacción de polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* activado y proteína transportadora se mantiene a un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

5 En un aspecto, el procedimiento de producción de un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado-proteína transportadora comprende la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo 8 aislado-proteína conjugado después de que éste se produce.

10 En un aspecto, el disolvente orgánico que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado-proteína transportadora es un disolvente aprótico polar. En un aspecto, el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), En un aspecto, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína transportadora el disolvente orgánico es DMSO.

15 En un aspecto, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado:proteína transportadora comprende la etapa de determinación de la concentración acuosa de la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8. En un aspecto, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que es equimolar con respecto a la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico.

20 En un aspecto, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que tiene una proporción molar de aproximadamente 0,5:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico. En un aspecto, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que tiene una proporción molar de 0,75:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico.

25 En un aspecto, el procedimiento que comprende la etapa de aislamiento del polisacárido activado comprende la etapa de diafiltración.

En un aspecto, el procedimiento que comprende la liofilización de la proteína transportadora, antes de la liofilización la proteína transportadora se somete a diafiltración frente a NaCl y la proporción en p/p de NaCl/proteína transportadora de proteína se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5. En un aspecto, la proporción de NaCl con respecto a proteína transportadora es de aproximadamente 1.

30 En un aspecto, la proteína transportadora que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado-proteína transportadora comprende CRM<sub>197</sub>.

En un aspecto, se hace que la CRM<sub>197</sub> que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado-proteína transportadora reaccione con el polisacárido de serotipo 8 activado en una proporción en peso de aproximadamente 1:1.

35 En un aspecto, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado-proteína transportadora comprende la etapa de mezclado del polisacárido capsular de tipo 8 con imidazol o triazol antes del mezclado con CDT en un disolvente orgánico.

40 En un aspecto, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado:proteína transportadora comprende la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 8-proteína transportadora para eliminar grupos de activación sin reaccionar.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de polisacárido capsular de tipo 8-proteína transportadora que se produce mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento

45 En un aspecto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de polisacárido capsular de tipo 8-proteína transportadora que se produce mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente o transportador. En una realización, las composiciones inmunogénicas comprenden un adyuvante basado en aluminio que puede seleccionarse del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento comprenden el adyuvante de fosfato de aluminio.

50

Las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento pueden comprender menos de un 30 % y menos de un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 o tipo 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 8. Las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento pueden almacenarse en agua o en un tampón de pH neutro de baja fuerza iónica.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de reducción o de prevención de una infección, enfermedad o afección por estafilococos asociada con una bacteria *Staphylococcus* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de forma terapéutica o profiláctica de una cantidad eficaz de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento al sujeto. En una realización, la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus* invasivo, septicemia y estado de portador.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de reducción o de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma profiláctica de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

En un aspecto, el procedimiento de la divulgación comprende la sustitución de CDT por CDI.

En un aspecto, la divulgación proporciona un polisacárido capsular de tipo 8 de *Staphylococcus aureus* que tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 800 kDa unido covalentemente a una proteína transportadora; en el que el peso molecular combinado del polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora es de entre aproximadamente 400 kDa y 5.000 kDa.

En un aspecto, el polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende una parte de polisacárido que tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa. En un aspecto, el polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2500 kDa.

0001 En un aspecto, la parte de proteína transportadora del polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende CRM<sub>197</sub>. En un aspecto, la CRM<sub>197</sub> se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida o ambos. En algunas realizaciones, la proporción molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM<sub>197</sub> es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1. En algunas realizaciones, el polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende al menos un enlace covalente entre CRM<sub>197</sub> al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende al menos un enlace entre CRM<sub>197</sub> y polisacárido que se produce en cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM<sub>197</sub> del polisacárido unido covalentemente a la CRM<sub>197</sub> comprende de 5 a 22 lisinas unidas covalentemente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM<sub>197</sub> del polisacárido unido covalentemente a la CRM<sub>197</sub> comprende de 5 a 23 lisinas unidas covalentemente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM<sub>197</sub> del polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende de 8 a 15 lisinas unidas covalentemente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM<sub>197</sub> del polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende de 8 a 12 lisinas unidas covalentemente con el polisacárido.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende un polisacárido de tipo 8 de *S. aureus* unido covalentemente a la proteína transportadora tal como se describe en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o transportador.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de administración de una composición inmunogénica que comprende un polisacárido de tipo 8 de *S. aureus* unido covalentemente a la proteína transportadora tal como se describe en el presente documento a un sujeto, para generar una respuesta inmunitaria tal como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de aislamiento de un polisacárido con un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo generado mediante un polisacárido capsular, un conjugado inmunogénico o una composición inmunogénica de la presente divulgación.

### **Breve descripción de los dibujos**

La presente invención se entenderá mejor y características, aspectos y ventajas diferentes de las que se exponen anteriormente se harán evidentes cuando se tengan en cuenta la siguiente descripción detallada de la misma. Tal descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en los que:

La **figura 1** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* (ácido N-acetil mannosaminurónico es ManNAc, N-acetil L-fucosamina es L-FucNAc y N-acetil D-fucosamina es D-FucNAc).

La **figura 2A** muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* (ensayo de O-Acetilo) y ácido teicoico (ensayo de fosfato); la **figura 2B** muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* mediante ensayo de inmunodifusión doble.

La **figura 3A** muestra el efecto del pH (3,5, 4 o 5) a 95 °C en la reducción del peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* en un tratamiento térmico;

La **figura 3B** muestra el efecto de la temperatura (55 °C, 75 °C o 95 °C) a un pH de 3,5 en la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* en un tratamiento térmico.

La **figura 4** muestra el peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* purificado en comparación con polisacárido capsular de serotipo 5 a lo largo del tiempo durante el tratamiento térmico a un pH de 3,5 y 4,5, respectivamente, y 95 °C.

La **figura 5** muestra un aumento de la supervivencia en ratones que recibieron un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM<sub>197</sub> (rombos) en comparación con los controles tratados con AlPO<sub>4</sub> (círculos).

La **figura 6** muestra una estructura de polisacárido de repetición de polisacárido de serotipo 5 de *S. aureus* (ácido N-acetil mannosaminurónico es ManNAcA, N-acetil L-fucosamina es L-FucNAc, y N-acetil D-fucosamina es D-FucNAcA).

La **figura 7A** muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido de serotipo 5 de *S. aureus* (ensayo de O-Acetilo) y ácido teicoico (ensayo de fosfato); la **figura 7B** muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido de serotipo 5 de *S. aureus* mediante ensayo de inmunodifusión doble.

La **figura 8A** muestra el efecto del pH (3,5, 4 o 5) a 95 °C en la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus* en un tratamiento térmico;

La **figura 8B** muestra el efecto de la temperatura (55 °C, 75 °C o 95 °C) a un pH de 3,5 tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus* en un tratamiento térmico.

La **figura 9** muestra una reducción de pielonefritis en ratones que recibieron un conjugado de polisacárido de serotipo 5-CRM<sub>197</sub> en comparación con los controles tratados con PBS (el área sombreada son los ratones tratados).

La **figura 10** muestra unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas en riñones después de una exposición a PFESA0266 de *S. aureus* en ratones vacunados con CP5-CRM de alto peso molecular (HMW, forma siglada de *high molecular weight*), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW, forma siglada de *low molecular weight*) o control de PP5-CRM

La **figura 11** muestra una comparación de títulos de OPA (forma siglada de *opsonophagocytic killing assay*, ensayo de destrucción opsofagocítica (media geométrica) a partir de suero que se obtiene de ratones vacunados con diferentes formulaciones de conjugado de polisacárido (CP5-CRM de alto peso molecular (HMW), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW)). Los grupos consistieron en 5 a 9 ratones.

## **Descripción detallada**

### *Visión de conjunto*

La presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 8 de *S. aureus* conjugados con CRM<sub>197</sub> y a procedimientos para su uso. Las características novedosas de los conjugados inmunogénicos de la divulgación incluyen los perfiles de peso molecular de los polisacáridos y de los conjugados resultantes, la proporción de lisinas conjugadas por proteína transportadora CRM<sub>197</sub> y el número de lisinas unidas covalentemente con el polisacárido, el número de enlaces covalentes entre la proteína transportadora y el polisacárido en función de las unidades de repetición del polisacárido, y la cantidad relativa de polisacárido libre en comparación con el polisacárido total. La expresión "polisacárido libre" tal como se usa en el presente documento significa un polisacárido que no está conjugado con la proteína transportadora, pero que está, no obstante, presente en la composición de conjugado.

Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas transportadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol) o CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol). CDI es específico sólo para la conjugación de CP8. El uso de CDI/CDT da como resultado un enlazador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína transportadora.

Las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento son útiles en una diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, los conjugados pueden usarse en la producción de composiciones inmunogénicas de conjugado para proteger a los receptores frente a infecciones por *S. aureus*. Alternativamente, los diversos conjugados pueden usarse en la producción de anticuerpos frente a polisacáridos capsulares bacterianos, que posteriormente pueden usarse en investigación y en ensayos clínicos de laboratorio, tal como serotipado y detección bacteriana. Tales anticuerpos pueden usarse también para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos que se producen frente a polisacáridos bacterianos son funcionales o bien en un modelo de eficacia animal o bien en un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

A menos que se defina de otro modo, todas las expresiones técnicas y científicas que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia a la que se refiere la invención. A pesar de que cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento pueden usarse en la práctica o realización de pruebas de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen en el presente documento. En la descripción de las realizaciones y reivindicaciones de la invención, determinada terminología se usará en conformidad con las

definiciones que se exponen a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a “el procedimiento” incluyen uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento y/o que se harán evidentes para un experto en la materia tras la lectura de la presente divulgación, etcétera.

Tal como se usa en el presente documento, “aproximadamente” significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor tal como un intervalo de concentraciones, período, peso molecular, temperatura o pH indicados. Un intervalo de este tipo puede estar dentro de un orden de magnitud, habitualmente dentro de un 20 %, aún más habitualmente dentro de un 10 % e incluso más habitualmente dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado. La variación admisible abarcada por el término “aproximadamente” dependerá del sistema particular sometido a estudio y puede apreciarse fácilmente por un experto en la materia. Siempre que se menciona un intervalo dentro de la presente solicitud, cada número entero en su totalidad dentro del intervalo se contempla también como una realización de la invención.

Se observa que en la presente divulgación, expresiones tales como “comprende”, “comprendido/a”, “comprendiendo/que comprende”, “contiene”, “conteniendo/que contiene” y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos; por ejemplo, éstas pueden significar “incluye”, “incluido”, “incluyendo/que incluye” y similares. Tales expresiones se refieren a la inclusión de unos componentes particulares o conjunto de componentes sin excluir cualesquiera otros componentes. Expresiones tales como “consistiendo/que consiste esencialmente en” y “consiste esencialmente en” tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos, por ejemplo, éstas permiten la inclusión de componentes o etapas adicionales que no restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, es decir, éstas excluyen componentes o etapas no mencionados adicionales que restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, y excluyen componentes o etapas de la técnica anterior, tal como documentos en la técnica que se citan en el presente documento, especialmente debido a que es un objetivo del presente documento definir unas realizaciones que pueden patentarse, por ejemplo, novedosas, no obvias, de la invención, sobre la técnica anterior, por ejemplo, sobre los documentos citados en el presente documento. Y, las expresiones “consiste en” y “consistiendo/que consiste en” tienen el significado que se atribuye a éstas en la ley de patentes de los Estados Unidos; a saber, que estas expresiones son cerradas. Por consiguiente, estas expresiones se refieren a la inclusión de un conjunto de componentes o un componente particular y a la exclusión de todos los otros componentes.

### 30 Conjugados inmunogénicos

Tal como se describe anteriormente, la presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 8 de *S. aureus* conjugados a CRM<sub>197</sub>. Un aspecto de la divulgación proporciona conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de *S. aureus* conjugado con una proteína o molécula transportadora que tiene una o más de las siguientes características: el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 700 kDa; el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 2500 kDa; y el conjugado comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre con respecto al polisacárido total. En algunos aspectos, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa. En algunos aspectos el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa. En otras realizaciones, el conjugado comprende menos de aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 10 % o aproximadamente un 5 % de polisacárido libre con respecto al polisacárido total.

Los “conjugados” tal como se usan en el presente documento, comprenden un polisacárido de cápsula normalmente de un intervalo deseado de peso molecular y una proteína transportadora, en el que el polisacárido de cápsula está conjugado con la proteína transportadora. Los conjugados pueden o pueden no contener alguna cantidad de polisacárido de cápsula libre. Tal como se usa en el presente documento, “polisacárido de cápsula libre” se refiere a un polisacárido de cápsula que está asociado no covalentemente con (es decir, está unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el polisacárido capsular-proteína transportadora conjugados. Las expresiones “polisacárido de cápsula libre”, “polisacárido libre” y “sacárido libre” pueden usarse de forma indistinta y se pretende que transmitan el mismo significado.

Con independencia de la naturaleza de la molécula transportadora, esta puede conjugarse con el polisacárido capsular o bien directamente o bien a través de un enlazador. Tal como se usa en el presente documento, “conjuguar”, “conjugado” y “conjugando” se refieren a un procedimiento mediante el cual un polisacárido capsular bacteriano se une covalentemente a la molécula transportadora. La conjugación potencia la inmunogenicidad del polisacárido capsular bacteriano. La conjugación puede realizarse de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación o mediante otros procedimientos que se conocen en la técnica.

El peso molecular del polisacárido capsular de *S. aureus* es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular son capaces de inducir determinadas respuestas inmunitarias de anticuerpos debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. El aislamiento de los “polisacáridos capsulares de alto peso molecular” se contempla para su uso en las

composiciones y procedimientos de la presente divulgación. En un aspecto de la divulgación, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 20 kDa a 1.000 kDa en peso molecular. En un aspecto de la divulgación, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 50 kDa a 700 kDa en peso molecular. En un aspecto de la divulgación, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 50 kDa a 300 kDa en peso molecular. En un aspecto, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular. En un aspecto, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 250 kDa en peso molecular. En un aspecto, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular. Otros intervalos de polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular que puede aislarse y purificarse mediante los procedimientos de la presente divulgación incluyen de 70 kDa a 100 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 160 kDa en peso molecular; e intervalos deseados similares de peso molecular. Cualquier número entero en su totalidad dentro de cualquiera de los intervalos anteriores se contempla como un aspecto de la divulgación.

En un aspecto, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 5.000 kDa en peso molecular. En un aspecto, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 5.000 kDa en peso molecular. En un aspecto, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En un aspecto, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En un aspecto, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 600 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En un aspecto, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 700 kDa y aproximadamente 2.700 kDa. En un aspecto, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 2.000 kDa; de entre aproximadamente 1.800 kDa y aproximadamente 2.500 kDa; de entre aproximadamente 1.100 kDa y aproximadamente 2.200 kDa; de entre aproximadamente 1.900 kDa y aproximadamente 2.700 kDa; de entre aproximadamente 1.200 kDa y aproximadamente 2.400 kDa; de entre aproximadamente 1.700 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.300 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.600 kDa y aproximadamente 3.000 kDa. Cualquier número entero en su totalidad dentro de cualquiera de los intervalos anteriores se contempla como un aspecto de la divulgación.

Tal como se usa en el presente documento, "inmunogénico" significa una capacidad de un antígeno (o un epítipo del antígeno), tal como un polisacárido capsular bacteriano o una composición inmunogénica de conjugado que comprende el antígeno, para suscitar una respuesta inmunitaria en un hospedador tal como un mamífero, o bien mediada de forma celular o bien humoral, o ambas. Por consiguiente, "conjugado inmunogénico" o "conjugado" tal como se usa en el presente documento significa cualquier conjugado inmunogénico que contiene un antígeno o determinante antigénico (es decir, epítipo) de un polisacárido capsular bacteriano conjugado con una molécula transportadora que puede usarse para suscitar una respuesta inmunitaria. El conjugado inmunogénico 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 o anticuerpos específicos de antígeno para permitir la protección futura de un hospedador inmunizado. Los conjugados inmunogénicos pueden por lo tanto proteger al hospedador frente a uno o más síntomas asociados con una infección por bacterias, o pueden proteger al hospedador frente a la muerte debida a la infección con bacterias asociadas con el polisacárido capsular. Los conjugados inmunogénicos pueden usarse también para generar unos anticuerpos policlonales o monoclonales, que pueden usarse para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. Los conjugados inmunogénicos pueden usarse también para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unión 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, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, a menos que el contexto indique otra cosa, se pretende que la expresión abarque no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos diseñados por ingeniería genética (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivatizados para modificar funciones efectoras, de estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), anticuerpos monocatenarios (ScFv) y de dominio, lo

que incluye anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos a condición de que éstos presenten la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpo 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 subclase de los mismos), y el anticuerpo no ha de ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas del anticuerpo, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en los seres humanos. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte preferentemente conserva al menos una, preferentemente la mayor parte o la totalidad, de las funciones que se asocian normalmente con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto.

El término “antígeno” se refiere en general a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido o conjugado en una composición inmunogénica, o sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de linfocitos T, o ambas, en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria puede generarse frente a la totalidad de la molécula, o frente a diversas partes de la molécula (por ejemplo, un epítipo o hapteno). El término puede usarse para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno se reconoce por anticuerpos, receptores de linfocitos T u otros elementos de la inmunidad humoral y/o celular específica. El “antígeno” también incluye todos los epítipos antigénicos relacionados. Los epítipos de un antígeno dado pueden identificarse usando una serie de técnicas de mapeo de epítipos, que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Human Press, Totowa, N.J. Por ejemplo, los epítipos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando de forma simultánea un gran número de péptidos en soportes sólidos, correspondiéndose los péptidos con partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos a la vez que los péptidos están aún unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De forma similar, los epítipos conformacionales pueden identificarse determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, citado anteriormente. Además, para los fines de la presente invención, “antígeno” también puede usarse para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tal como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa, si bien éstas pueden ser no conservativas), en la secuencia nativa, a condición de que la proteína mantenga la capacidad para suscitar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida, o a través de unos procedimientos de síntesis particulares, o a través de un enfoque de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de hospedadores, lo cuales producen los antígenos. Además, el antígeno puede proceder, obtenerse o aislarse a partir de un microbio, por ejemplo, una bacteria, o puede ser un organismo completo. De forma similar, se incluye también en la definición un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico. Además, se incluyen los antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítipos, epítipos flanqueante, y otros antígenos obtenidos de forma sintética o recombinante (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) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, de 28 de Junio a 3 de Julio de 1998).

Una respuesta inmunitaria “protectora” se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para suscitar una respuesta inmunitaria, o bien mediada de forma celular o bien humoral, o ambas, que sirve para proteger a un sujeto frente a una infección. La protección que se prevé no ha de ser absoluta, es decir, la infección no ha de prevenirse o erradicarse totalmente, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control de sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se administró la vacuna o composición inmunogénica. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o rapidez de la aparición de los 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 un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En situaciones particulares, una “respuesta inmunitaria protectora” podría incluir la inducción de un aumento del doble en los niveles de anticuerpos o de un aumento de cuatro veces en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes están relacionados con una respuesta inmunitaria protectora. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria protectora puede someterse a ensayo midiendo la disminución en porcentaje en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo, los que se describen a continuación. Preferentemente, hay una disminución en el recuento de bacterias de al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. La “cantidad inmunogénica” de un conjugado particular en una

composición se dosifica en general basándose en el polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un polisacárido capsular de serotipo 8 conjugado con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 mcg de polisacárido no conjugado en una dosis de 100 mcg. Normalmente, la contribución de la proteína al conjugado no se considera cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 mcg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg, y más en particular de 1 a 10 mcg.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, ave, pez, reptil o cualquier otro animal. El término "sujeto" también incluye seres humanos. El término "sujeto" también incluye mascotas domésticas. Los ejemplos no limitantes de mascotas domésticas incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, gerbos, hámsteres, cobayas, hurones, aves, serpientes, lagartos, peces, tortugas y ranas. El término "sujeto" también incluye animales de producción. Los ejemplos no limitantes de animales de producción incluyen: alpaca, bisonte, camello, ganado bovino, ciervo, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, reno, yak, gallinas, gansos y pavos.

Tal como se muestra en la figura 1, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8 de *S. aureus* tienen las siguientes estructuras: serotipo 5 [ $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-ManNAcA-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-Ac- $\alpha$ -L-FucNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -DFucNAc-(1 $\rightarrow$ )n. y serotipo 8 [ $\rightarrow$ 3)-4-O-Ac- $\beta$ -D-ManNAcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-FucNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -DFucNAc-(1 $\rightarrow$ )n. Véase Jones (2005) Carbohidr. Res. 340:1097-1106. El polisacárido capsular de serotipo 8 tiene unas unidades de repetición de trisacárido similares a las del polisacárido capsular de serotipo 5; no obstante, éstos se diferencian en los enlaces de azúcar y en los sitios de O-acetilación, que producen unos patrones serológicamente diferentes de inmunoreactividad (Fournier y col. (1984) Infect. Immun. 45:87 a 93; y Moreau y col. (1990) Carbohydr. Res. 201:285-297). Los polisacáridos capsulares de serotipo 8 y 5 son, por lo tanto, hidratos de carbono relativamente complejos que son solubles en agua, normalmente ácidos y de los que se pensaba previamente que tenían unos pesos moleculares de aproximadamente 25 kDa (Fattom (1990) Infect. Immun. 58, 2367-2374).

Los polisacáridos capsulares de serotipo 8 de la invención están O-acetilados. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de polisacárido capsular de tipo 8 es de un 80-100 %, de un 90-100 %, o de un 80-90 %.

El grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante una RMN de protones (Lemerminier y Jones 1996, Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones y Lemerminier 2002, J Pharmaceutical and Biomedical analysis 30; 1233-1247, documentos WO 05/033148 o WO 00/56357). Otro procedimiento que se usa normalmente se describe por Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261.

En algunos aspectos, los polisacáridos capsulares de serotipo 8 de la divulgación se usan para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que demuestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que verifica la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

Los polisacáridos capsulares tales como de serotipo 5 u 8 pueden obtenerse directamente a partir de bacterias usando unos procedimientos de aislamiento conocidos por un 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 los Estados Unidos n.º 2007/0141077; y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 00/56357). Además, éstos pueden producirse usando protocolos de síntesis. Además, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 puede producirse de forma recombinante usando unos procedimientos de ingeniería genética también conocidos por un experto en la materia (véase Sau y col. (1997) Microbiology 143:2395 -2405; y la patente de los Estados Unidos n.º 6.027.925).

Una cepa de *S. aureus* que puede usarse para obtener polisacárido capsular de serotipo 8 aislado es la R2 PFESA0286 de *S. aureus*. Esta cepa se seleccionó mediante citometría de flujo con anticuerpos anti polisacárido de serotipo 8 de conejo después de un cultivo de PFESA0286 de *S. aureus* (Colección Americana de Cultivos Tipo; Manassas, VA; n.º de referencia de ATCC n.º 49525;) en caldo modificado de Frantz. Durante la citometría de flujo se observaron dos poblaciones, R1 y R2. R1 y R2 se purificaron y volvieron a cultivarse. R2 produjo un polisacárido capsular de serotipo 8. El análisis citométrico de flujo mostró una intensidad de fluorescencia homogénea. En ese sentido, R2 se seleccionó para la producción de polisacárido capsular de serotipo 8.

Una cepa de *S. aureus* que puede usarse para obtener polisacárido capsular de serotipo 5 aislado es PFESA0266 de *S. aureus*. Esta cepa produce un polisacárido capsular de serotipo 5 durante el crecimiento, y la producción alcanza su máximo cuando las células se encuentran en una fase estacionaria. Pueden usarse para fabricar los polisacáridos respectivos otras cepas de tipo 5 o tipo 8 de *S. aureus*, que se obtienen o bien a partir de colecciones de cultivo establecidas o bien muestras de ensayo clínicas.

Otro componente del conjugado inmunogénico de la divulgación es una proteína o molécula transportadora con la que se conjuga el polisacárido capsular bacteriano. La expresión "transporte de proteína" o "proteína transportadora" se refiere a cualquier molécula de proteína que puede conjugarse con un antígeno (tal como los polisacáridos

capsulares) frente a la que se desea una respuesta inmunitaria. La conjugación con un portador puede potenciar la inmunogenicidad del antígeno. La conjugación puede realizarse mediante procedimientos convencionales. Los portadores de proteína preferidos para los antígenos son toxinas, toxoides o cualquier material de reacción cruzada mutante (CRM, forma siglada de *cross-reactive material*) de la toxina de tétanos, difteria, tos ferina, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. En una realización, un portador particularmente preferido es CRM<sub>197</sub> del toxoide diftérico, obtenido de la cepa C7 de *C. diphtheriae* (β197), la cual produce la proteína CRM<sub>197</sub>. Esta cepa tiene el n.º de referencia de ATCC 53281. Un procedimiento para producir la CRM<sub>197</sub> se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 5.614.382. Alternativamente, puede usarse un fragmento o epítipo del transportador de proteína u otra proteína inmunogénica. Por ejemplo, un antígeno hapténico puede acoplarse a un epítipo de linfocito T de una toxina, toxoide o CRM bacterianos. Véase la solicitud de patente de los 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 transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide colérico (por ejemplo, tal como se describe en la solicitud de patente internacional n.º WO 2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas de la membrana exterior bacteriana tales como el complejo de la membrana exterior c (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de superficie neumocócica A (PspA), proteína de adhesión neumocócica (PsaA) o proteína de *Haemophilus influenzae* D. También pueden usarse como proteínas transportadoras otras proteínas, tales como ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH, forma siglada de *keyhole limpet hemocyanin*), seroalbumina bovina (BSA) o derivado de proteína purificado de la tuberculina (PPD).

La proteína transportadora dentro del conjugado inmunogénico de la invención es la CRM<sub>197</sub>, y la CRM<sub>197</sub> se une covalentemente con el polisacárido capsular a través de un enlace de carbamato y un enlace de amida. El número de restos de lisina en la proteína transportadora que se han conjugado con un polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM<sub>197</sub> puede comprender de 5 a 15 lisinas de 39 unidas covalentemente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM<sub>197</sub> están unidas covalentemente con el polisacárido capsular. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM<sub>197</sub> puede comprender de 18 a 22 lisinas de 39 unidas covalentemente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 40 % a un 60 % de lisinas de CRM<sub>197</sub> están unidas covalentemente con el polisacárido capsular. En algunas realizaciones, la CRM<sub>197</sub> comprende de 5 a 15 lisinas de 39 unidas covalentemente con el CP8. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM<sub>197</sub> están unidas covalentemente con el CP8.

Tal como se analiza anteriormente, el número de restos de lisina en la proteína transportadora conjugado con el polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas, que puede expresarse como una proporción molar. Por ejemplo, la proporción molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM<sub>197</sub> en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 22:1. En una realización, el intervalo de proporción molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM<sub>197</sub> en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 25:1. En una realización, el intervalo de proporción molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM<sub>197</sub> en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 16:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 14:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 12:1; de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 26:1; de aproximadamente 22:1 a aproximadamente 28:1; de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 30:1; de aproximadamente 26:1 a aproximadamente 32:1; de aproximadamente 28:1 a aproximadamente 34:1; de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 36:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; o de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 30:1.

Otra forma de expresar el número de restos de lisina en la proteína transportadora conjugados con el polisacárido capsular puede ser como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP8 dado, la CRM<sub>197</sub> puede comprender de 5 a 15 lisinas de 39 unidas covalentemente con el polisacárido capsular. Alternativamente, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP8 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre un 10 % y un 50 %. En algunas realizaciones, de un 20 % a un 50 % de lisinas pueden estar unidas covalentemente con el CP8. Aún alternativamente, de un 30 % a un 50 % de lisinas de CRM<sub>197</sub> pueden estar unidas covalentemente con el CP8; de un 10 % a un 40 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 20 % a un 40 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 25 % a un 40 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 30 % a un 40 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 15 % a un 30 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 20 % a un 30 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 25 % a un 30 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; de un 10 % a un 15 % de lisinas de CRM<sub>197</sub>; o de un 10 % a un 12 % de lisinas de CRM<sub>197</sub> están unidas covalentemente con el CP8.

La frecuencia de unión de la cadena de polisacárido capsular a una lisina en la molécula transportadora es otro parámetro para la caracterización de conjugados de polisacáridos de cápsula. Por ejemplo, en una realización, tiene lugar al menos un enlace covalente entre CRM<sub>197</sub> y polisacárido para al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra realización, hay al menos un enlace covalente entre CRM<sub>197</sub>

5 y el polisacárido capsular para cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 7 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 9 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 7 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 15 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 6 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 7 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada de 7 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 20 unidades de repetición de sacárido; o cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra realización, tiene lugar al menos un enlace entre CRM<sub>197</sub> y el polisacárido capsular para cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular.

15 Adicionalmente se desvela una composición inmunogénica que comprende cualquiera de los conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* conjugado con una proteína transportadora descrita anteriormente.

20 La expresión "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo, un microorganismo o un componente del mismo, composición que puede usarse para suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger a o para tratar un ser humano susceptible de infección por *S. aureus*, mediante la administración de las composiciones inmunogénicas a través de una vía sistémica, dérmica o mucosa o usarse para generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales que podría usarse para conferir inmunidad pasiva a otro sujeto. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, se usa una administración intranasal para el tratamiento o prevención del estado de portador nasofaríngeo de *S. aureus*, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana. Pueden usarse también composiciones inmunogénicas para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

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

35 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir también uno o más de los siguientes antígenos: ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE MntC/SitC/Proteína de unión de saliva, IsdB, IsdA, Opp3a, DltA, HtsA, LtaS, SdrH, SrtA, Spa, SBI, alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína A de unión a fibronectina (fnbA), coagulasa, map, leucocidina de Pantón-Valentine (pvl), gamma-toxina (hlg), ica, transportador ABC inmunodominante, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, SasF, SasH, EFB (FIB), FnbB, Npasa, EBP, sialoproteína II de unión a hueso, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna, TSST-1, mecA, dPNAG, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2 HBP, proteína de unión a vitronectina, HarA, Enterotoxina A, Enterotoxina B, Enterotoxina C1 y autolisina novedosa.

45 En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden además al menos uno de un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación por radicales libres, un diluyente o un transportador. En una realización, el adyuvante dentro de la composición inmunogénica de la invención es un adyuvante basado en aluminio. En una realización, el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio que se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, el adyuvante es fosfato de aluminio.

50 Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha demostrado que una serie de citocinas o linfocinas tienen una actividad de modulación inmunitaria, y por lo tanto pueden ser útiles de una forma igual o similar a adyuvantes, incluyendo, pero sin limitación, las interleucinas 1- $\alpha$ , 1- $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.078.996 y número de referencia de ATCC 39900); factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ . Aún otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento incluyen quimiocinas, incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES; moléculas de adhesión, tal como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas de tipo mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas tal como PECAM, las ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimulantes tales como B7-1, B7-2, CD40 y CD40L; factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento

epidérmico, PDGF, BL-1, y factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas receptoras incluyendo Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6, y caspasas, incluyendo ICE.

5 Los adyuvantes adecuados que se usan para potenciar una respuesta inmunitaria pueden incluir además, sin limitación, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado, Corixa; Hamilton, MT), que se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes, análogos de lípido A de síntesis o compuestos de fosfato de aminoalquilglucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles a través de Corixa, y los que se describen en la patente de los Estados Unidos n.º 6.113.918. Un  
10 AGP de este tipo es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosido, que se conoce también como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (FA) o como una emulsión estable (EE).

Aún otros adyuvantes incluyen péptidos de muramilo, tal como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxfosforilo)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de  
15 aceite en agua, tal como MF59 (patente de los Estados Unidos n.º 6.299.884) (que contiene escualeno al 5 %, Polisorbato 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 % (contiene que opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) que se formulan para dar partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), y SAF (que contiene escualeno al 10 %, Polisorbato 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado con Pluronic al 5 % y thr-MDP, o bien microfluidizado para dar una emulsión submicrométrica o bien  
20 mediante agitación con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande); adyuvante de Freund incompleto (AFI); sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Amphigen; Avridine; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glicósido; polioles de pluronic; *Bordetella* inactivada; saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), que se describen en la patente de los Estados Unidos n.º 5.057.540, Iscomatrix® (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 5.254.339 y complejos inmunostimulantes (ISCOMS); *Mycobacterium tuberculosis*; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos de síntesis tales como oligonucleótidos que contienen un motivo de CpG (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.207.646); CI-31 (Intercell AG, Viena, Austria), que se describe en las patentes EP n.º. 1.296.713 y 1.326.634; una toxina de tos ferina (PT) o una mutante de la misma, una  
25 toxina colérica o una mutante de la misma (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640) o una toxina de *E. coli* termolábil (LT) o una mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-R72 (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

La composición inmunogénica puede comprender opcionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable. La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" significa un transportador aprobado por un organismo de control de un gobierno estatal, uno Federal u otro organismo de regulación, o que se enumera en la Farmacopea de  
35 los Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, incluyendo seres humanos así como mamíferos no humanos. La expresión "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Pueden emplearse como transportadores líquidos agua, soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, en particular para disoluciones inyectables. Se describen ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. La formulación ha de adecuarse al modo de administración.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender además uno o más "inmunomoduladores" adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmunitario, de tal modo que se observa o bien una regulación por aumento o bien una regulación por disminución de la inmunidad mediada de  
45 forma celular y/o humoral. En una realización, se proporciona la regulación por aumento de las armas mediadas de forma celular y/o humoral del sistema inmunitario. Los ejemplos de determinados inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citocina, o Iscomatrix® (CSL Limited; Parkville, Australia), que se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 5.254.339, entre otros. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden usarse en la composición inmunogénica de la presente invención incluyen el sistema de adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero Block (CytRx; Atlanta, GA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), Adyuvante Amphigen®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil lípido A y adyuvante lípido-amina Avridine. Los ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la composición inmunogénica de la invención incluyen las formulaciones SEAM62 y SEAM 1/2 modificadas. La SEAM62 modificada es una emulsión de aceite en  
50 agua que contiene un 5 % (v/v) de escualeno (Sigma), un 1 % (v/v) de detergente Span® 85 (ICI Surfactants), un 0,7 % (v/v) de detergente polisorbato 80 (ICI Surfactants), un 2,5 % (v/v) de etanol, Quil A 200 mcg/ml, colesterol 100 mcg/ml y un 0,5 % (v/v) de lecitina. La SEAM 1/2 modificada es una emulsión de aceite en agua que comprende un 5 % (v/v) de escualeno, un 1 % (v/v) de detergente Span® 85, un 0,7 % (v/v) de detergente Polisorbato 80, un 2,5 % (v/v) de etanol, Quil A 100 mcg/ml y colesterol 50 mcg/ml. Otros "inmunomoduladores" que pueden incluirse  
55 en la composición inmunogénica incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones u otras citocinas o quimiocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como los que se describen en las patentes de los Estados Unidos n.º 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Ha de entenderse que el inmunomodulador y/o el adyuvante que va a usarse dependerá del sujeto

al que se administrará la composición inmunogénica, la vía de inyección y el número de inyecciones que van a darse.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además uno o más conservantes además de una pluralidad de conjugados de polisacárido capsular estafilocócico-proteína. La FDA requiere que los productos biológicos en viales de múltiples dosis (múltiples dosis) contengan un conservante, con sólo unas pocas excepciones. Los productos de vacuna que contienen conservantes incluyen vacunas que contienen cloruro de benzetonio (carbunco), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (neumo., antitifoidea (parenteral), virus de la variolovacuna) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, gripe, JE, Mening., neumo., rabia). Los conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de benzetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato fenilmercúrico.

Las formulaciones de la invención pueden comprender además uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar y un antioxidante tal como un depurador de radicales libres o agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de un componente cualquiera, por ejemplo, un quelante, puede determinar si es conveniente otro componente (por ejemplo, un depurador) o no. La composición final que se formula para la administración ha de ser estéril y/o exenta de pirógenos. El experto puede determinar de forma empírica qué combinaciones de estos y otros componentes serán óptimas para la inclusión en las composiciones inmunogénicas que contengan conservante de la invención, dependiendo de una diversidad de factores tales como las condiciones de almacenamiento y de administración particulares que se requieren.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones fisiológicamente aceptables que se seleccionan de, pero sin limitación, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En determinadas realizaciones, la formulación está tamponada en un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

En determinadas realizaciones, puede ser conveniente ajustar el pH de la composición inmunogénica o formulación de la invención. El pH de una formulación de la invención puede ajustarse usando técnicas convencionales en la técnica. El pH de la formulación puede ajustarse para ser de entre 3,0 y 8,0. En determinadas realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede ajustarse para ser, de entre 3,0 y 6,0, 4,0 y 6,0, o 5,0 y 8,0. En otras realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede ajustarse para ser, de aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8,0. En determinadas realizaciones, el pH puede ser, o puede ajustarse para estar, en un intervalo de 4,5 a 7,5, o de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2, de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,5, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 o de 7,5 a 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,8.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluyendo pero sin limitación,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  y  $MnCl_2$ , a una concentración que varía de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, prefiriéndose de hasta aproximadamente 5 mM.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, incluyendo pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio y sulfato de potasio, presentes a una fuerza iónica que es fisiológicamente aceptable para el sujeto tras la administración parenteral e incluidas a una concentración final para producir una fuerza iónica u osmolaridad seleccionadas en la formulación final. La fuerza iónica u osmolaridad finales de la formulación estará determinada por múltiples componentes (por ejemplo, iones de compuesto tamponador (o compuestos tamponadores) y otras sales no tamponadoras. Una sal preferida, NaCl, está presente desde un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, seleccionándose las concentraciones de sal para complementar otros componentes (por ejemplo, azúcares) de tal modo que la osmolaridad total final de la formulación sea compatible con la administración parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea) y propicie la estabilidad a largo plazo de los componentes inmunogénicos de la formulación de composición inmunogénica a lo largo de diversos intervalos de temperatura. Las formulaciones sin sal tolerarán intervalos aumentados del uno o más crioprotectores seleccionados para mantener los niveles de osmolaridad finales deseados.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores que se seleccionan de, pero sin limitación, disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) y polihidroxihidratos de carbono (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

En determinadas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 200 mOs/l a aproximadamente 800 mOs/l, con un intervalo preferido de aproximadamente 250 mOs/l a aproximadamente 500 mOs/l, o de aproximadamente 300 mOs/l - aproximadamente 400 mOs/l. Una formulación sin

sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 25 % de sacarosa, y preferentemente de aproximadamente un 7 % a aproximadamente un 15 %, o aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 12 % de sacarosa. Alternativamente, una formulación sin sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 12 % de sorbitol, y preferentemente de aproximadamente un 4 % a un 7 %, o aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 6 % de sorbitol. Si se añade una sal tal como cloruro de sodio, entonces el intervalo eficaz de sacarosa o sorbitol se reduce relativamente. Estas y otras consideraciones tales como la osmolalidad y la osmolaridad se conocen bien en la técnica.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres y/o agentes de quelación. Se conocen en la técnica una diversidad de depuradores de radicales libres y agentes quelantes, y se aplican a las formulaciones y los procedimientos de uso que se describen en el presente documento. Los ejemplos incluyen pero no sin limitación, etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA, y diversas combinaciones de dos o más de los anteriores. En determinadas realizaciones, puede añadirse al menos un depurador de radicales libres no reductor a una concentración que potencia de forma eficaz la estabilidad a largo plazo de la formulación. También puede añadirse uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres/quelantes en diversas combinaciones, tal como un depurador y un catión divalente. La elección de quelante determinará si es necesaria o no la adición de un depurador.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos iónicos, incluyendo pero sin limitación, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitano, Polisorbato-80 (Tween 80), Polisorbato-60 (Tween 60), Polisorbato-40 (Tween 40) y Polisorbato-20 (Tween 20), polioxietileno-alkil éteres, 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 Pluronic (por ejemplo, Pluronic 121), prefiriéndose como componentes Polisorbato-80 a una concentración de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,25 %) o Polisorbato-40 a una concentración de aproximadamente un 0,001 % a un 1 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,5 %).

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes de estabilización adicionales adecuados para la administración parenteral, por ejemplo, un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ejemplo, cisteína, N-acetilcisteína, glutatión reducido, tioglicolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol o mezclas de los mismos). Alternativa u opcionalmente, las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden estabilizarse adicionalmente eliminando el oxígeno de los recipientes de almacenamiento, protegiendo a la formulación de la luz (por ejemplo, usando recipientes de vidrio de color ámbar).

Las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden comprender uno o más transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que incluye cualquier excipiente que no induce por sí mismo una respuesta inmunitaria. Los excipientes adecuados incluyen pero sin limitación macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col, 2001, Vaccine, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales transportadores son bien conocidos por el experto. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se analizan, por ejemplo, en Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones de la invención pueden estar liofilizadas o en forma acuosa, es decir disoluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas pueden administrarse de forma ventajosa directamente a partir de su forma envasada y son, por lo tanto, ideales para inyección sin la necesidad de reconstitución en medio acuoso tal como se requiere de otro modo para composiciones liofilizadas de la invención.

La suministro directo de composiciones inmunogénicas de la presente invención a un sujeto puede llevarse a cabo mediante la administración parenteral (por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intravenosa o en el espacio intersticial de un tejido); o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. En una realización preferida, la administración parenteral es mediante inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o el brazo del sujeto. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. Las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas, por ejemplo, para inyección o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones. En determinadas realizaciones, la composición puede prepararse como un polvo o pulverización para su administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición puede prepararse como un supositorio u óvulo vaginal, o para su administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como una pulverización, gotas, gel o polvo.

La cantidad de conjugado en cada dosis de composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Tal cantidad puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. 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.

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

#### *Acondicionamiento y formas de dosificación*

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o de múltiples dosis (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis o más). Para formas de múltiples dosis, habitualmente pero no necesariamente se prefieren los viales con respecto a las jeringuillas previamente cargadas. Los formatos de múltiples dosis adecuados incluyen pero sin limitación: de 2 a 10 dosis por recipiente 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 WO2007/127668.

Las composiciones pueden presentarse en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o pueden presentarse en dispositivos de suministro previamente cargados, por ejemplo, jeringuillas de un solo componente o múltiples componentes, que pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringuilla habitualmente, pero no necesariamente, contiene una dosis individual de la composición inmunogénica que contiene conservante de la invención, a pesar de que también se prevén jeringuillas de múltiples dosis, cargadas previamente. Asimismo, un vial puede incluir una dosis individual pero alternativamente puede incluir múltiples dosis.

Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis típica de la composición para 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, joven, adolescente, niño o lactante (es decir, no más de un año de edad) y en realizaciones preferidas puede administrarse mediante inyección.

Las composiciones inmunogénicas líquidas de la invención son también adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando una composición inmunogénica va a usarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringuillas cargadas preparadas, o uno o más de cada, usándose el contenido de la jeringuilla para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección, o viceversa.

Alternativamente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden liofilizarse y reconstituirse, por ejemplo, usando uno de una multitud de procedimientos para la liofilización que se conocen bien en la técnica para formar partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esférica), tal como microgránulos o esferas, que tienen características de partícula tales como tamaños de diámetro medio que pueden seleccionarse y controlarse variando los procedimientos exactos que se usan para prepararlos. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender además un adyuvante que puede prepararse opcionalmente con o estar contenido en partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esféricas) separadas tales como microgránulos o esferas. En tales realizaciones, la presente invención proporciona además un kit de composición inmunogénica que comprende un primer componente que incluye una composición inmunogénica seca, estabilizada, que comprende además, opcionalmente, uno o más conservantes de la invención, y un segundo componente que comprende una disolución acuosa, estéril, para la reconstitución del primer componente. En determinadas realizaciones, la disolución acuosa comprende uno o más conservantes, y puede comprender opcionalmente al menos un adyuvante (véase, por ejemplo, el documento WO2009/109550).

Aún en otra realización, un recipiente del formato de múltiples dosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en, pero sin limitación, artículos de vidrio de laboratorio generales, matraces, vasos de precipitado, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, frascos, viales, cierres para viales (por ejemplo, un tapón de caucho, un tapa a rosca), ampollas, jeringuillas, jeringuillas de doble cámara o de múltiples cámaras, tapones de jeringuilla, émbolos de jeringuillas, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El recipiente de la presente invención no está limitado en cuanto al material de fabricación e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una realización particular, el recipiente del formato es un vial de vidrio Schott tipo 1 de 5 ml con un tapón de butilo. El experto apreciará que el formato expuesto anteriormente no es de ningún modo una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como guía para el experto con respecto a la diversidad de formatos disponibles para la presente invención. Pueden encontrarse formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención en catálogos publicados de vendedores y fabricantes de equipos de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

#### *Procedimientos para fabricar conjugados inmunogénicos*

La presente divulgación también incluye procedimientos de fabricación de los conjugados inmunogénicos que se describen en el presente documento. Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas transportadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol) o CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol).

Por consiguiente, se desvela adicionalmente un procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* conjugado con una proteína transportadora, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) combinar un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* con imidazol o triazol para producir un polisacárido combinado; b) hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT en un disolvente orgánico y aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 % p/v de agua para producir un polisacárido capsular de serotipo 8 activado; c) purificar el polisacárido capsular de serotipo 8 activado para producir un polisacárido capsular de serotipo 8 activado purificado; d) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 8 activado purificado con una proteína transportadora en el disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína transportadora; y e) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína transportadora para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* conjugado con una proteína transportadora. En una realización, antes de la etapa (d), el polisacárido capsular de serotipo 8 activado purificado se combina con una proteína transportadora.

Se proporciona otro procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus* conjugado con una proteína transportadora, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) combinar un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* con imidazol o triazol para producir un polisacárido combinado; b) hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT en un disolvente orgánico y aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 % p/v de agua para producir un polisacárido capsular de serotipo 8 activado; c) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 8 activado con una proteína transportadora en el disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína transportadora; y d) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína transportadora para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* conjugado con una proteína transportadora.

En una realización, el disolvente orgánico dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico es un disolvente aprótico polar. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar que se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona y hexametilfosforamida (HMPA). En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

En una realización, la etapa de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende proporcionar un exceso molar de CDT de aproximadamente 20 veces en comparación con el polisacárido. En una realización, la etapa de purificar el polisacárido capsular de serotipo 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende diafiltración.

En una realización, la proteína transportadora dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico es la CRM<sub>197</sub>. En una realización, el polisacárido capsular de serotipo 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación de un conjugado inmunogénico se hace que reaccione con la CRM<sub>197</sub> en una proporción en peso de aproximadamente 1:1.

En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 8:proteína transportadora para eliminar grupos de activación sin reaccionar dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende la dilución en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C. En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína transportadora comprende la dilución en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

En una realización, se purifica el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína transportadora producido de acuerdo con los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico. En una realización, la purificación del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína transportadora comprende diafiltración.

En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico, el polisacárido combinado de serotipo 8 se liofiliza y vuelve a suspender. En una realización, tanto el polisacárido combinado como la proteína transportadora se liofilizan por separado y se vuelven a suspender antes de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT. En una realización, el polisacárido combinado liofilizado y/o la proteína transportadora liofilizada se vuelven a suspender en un disolvente orgánico. En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 8 activado combinado con una proteína transportadora dentro del procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico, el polisacárido capsular de serotipo 8 activado purificado y la proteína transportadora se liofilizan por separado y se vuelven a suspender. En una realización, la proteína transportadora es la CRM<sub>197</sub> y antes de la liofilización la CRM<sub>197</sub>

se somete a diafiltración frente a NaCl. En una realización, antes de la liofilización la CRM<sub>197</sub> se somete a diafiltración frente a NaCl y la proporción en p/p de NaCl/CRM se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5.

5 Tal como se usa en el presente documento, "liofilización" significa un procedimiento de deshidratación el que el polisacárido capsular bacteriano se congela mientras que se reduce la presión del entorno en presencia de suficiente calor para permitir que el agua congelada sublime directamente de una fase sólida a una fase gaseosa. Puede usarse procedimiento conocido en la técnica para liofilizar polisacáridos. Véase, por ejemplo, Harris y Angal (1989) "Protein Purification Methods", en: Kennedy & Cabral, eds. "Recovery Processes for Biological Materials" (John Wiley & Sons; 1993); la patente de los Estados Unidos n.º 4.134.214 y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2003/086471. Opcionalmente, puede incluirse un crioprotector durante la liofilización, tal como, por ejemplo, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, arabinosa, xilosa, galactosa, sorbitol o manitol.

10 Tal como se usa en el presente documento, "activar" y "activación" significa que un polisacárido capsular bacteriano o proteína transportadora se modifica de tal modo que se vuelve susceptible de conjugación (es decir, al menos una fracción debe hacerse capaz de unirse covalentemente a la molécula transportadora). Por ejemplo, con respecto a los procedimientos de conjugación basados en CDT de la presente invención, el polisacárido se activa en un entorno de baja humedad (por ejemplo, en DMSO) para formar fracciones de carbamato de triazol con fracciones de aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. Los polisacáridos activados pueden hacerse reaccionar a continuación con la proteína CRM<sub>197</sub>, lo que conduce al desplazamiento nucleófilo del triazol por restos de lisina dentro de CRM<sub>197</sub> y a la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados).

15 De acuerdo con los procedimientos de la divulgación, pueden purificarse los polisacáridos capsulares, proteínas transportadoras y/o conjugados de polisacárido-proteína. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para purificar polisacáridos o proteínas, tal como concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración profunda. Véase, por ejemplo, Farrés y col. (1996) *Biotechnol. Tech.* 10:375-380; Gonçalves y col. en: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (Antonio Mendez Vilas, ed. 1ª ed. Badajoz, España: Formatex; 2007, pág. 450-457); Tanizaki y col. (1996) *J. Microbiol. Methods* 27:19-23 y la patente de los Estados Unidos n.º 6.146.902, y la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2008/0286838.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aislado" o "purificado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de manera natural o de su organismo hospedador si éste es una entidad recombinante, o se lleva de un entorno a un entorno diferente). Por ejemplo, un polisacárido, péptido o proteína aislado está sustancialmente exento de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido de la que se obtiene la proteína, o sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente o está presente de otro modo en una mezcla como parte de una reacción química. En la presente invención, la proteína o polisacárido puede aislarse a partir de la célula bacteriana o a partir del residuo celular, de tal modo que se proporciona en una forma útil en la fabricación de una composición inmunogénica. La expresión "aislado" o "aislar" puede incluir purificar, o la purificación, incluyendo por ejemplo, los procedimientos de purificación de los polisacáridos capsulares, tal como se describe en el presente documento. La expresión "sustancialmente exento de material celular" incluye preparaciones de un polisacárido/polipéptido/proteína en las que el polisacárido/polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un polipéptido/proteína, polisacárido o conjugado que está sustancialmente exento de material celular u otros compuestos incluye preparaciones del polipéptido/proteína, polisacárido o conjugado que tienen menos de aproximadamente un 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o un 1 % (en peso seco) de proteína, polisacárido, u otros compuestos contaminantes. Cuando el polipéptido/proteína se produce de forma recombinante, está también preferentemente sustancialmente exento de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o un 1 % del volumen de la preparación de proteína. Cuando el polipéptido/proteína o polisacárido se produce mediante síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína o polisacárido. Por consiguiente, tales preparaciones del polipéptido/proteína o polisacárido tienen menos de aproximadamente un 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o un 1 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del fragmento de polipéptido/proteína o polisacárido de interés.

25 Los conjugados inmunogénicos que se producen mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento pueden almacenarse en agua o en un tampón de pH neutro de baja fuerza iónica o liofilizarse en un polvo seco.

#### *Procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria y proteger frente a la infección por S. Aureus*

30 La presente divulgación también incluye procedimientos de uso para composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Por ejemplo, la divulgación proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria frente a *S. aureus* que comprende la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica

de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. La divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento de protección de un sujeto frente a una infección por *S. aureus*, o un procedimiento de prevención de la infección por *S. aureus*, o un procedimiento de reducción de la gravedad de o retraso de la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección provocada por *S. aureus*, comprendiendo los procedimientos la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. La divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento de tratamiento o prevención de una infección, enfermedad o afección estafilocócica asociada con *Staphylococcus* sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición inmunogénica que se describe en el presente documento al sujeto. En algunos aspectos, el procedimiento de tratamiento o prevención de una infección, enfermedad o afecciones estafilocócicas comprende tratamiento de seres humanos, veterinaria, de animales o en la agricultura. Otro aspecto proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una infección, enfermedad o afección estafilocócica asociada con *Staphylococcus* sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de la composición inmunogénica que se describe en el presente documento, y usando dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. La divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento de prevención de una infección estafilocócica en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad profilácticamente eficaz de una composición inmunogénica que se describe en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

Una "respuesta inmunitaria" frente a un antígeno o composición inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células frente a moléculas presentes en el antígeno o composición de vacuna 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 generación de anticuerpos que reconocen y se unen con cierta afinidad por el antígeno en la composición inmunogénica de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria mediada por células" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" se suscita mediante la presentación de epítopos antígenicos en asociación con moléculas de clase I o de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), CD1 u otras moléculas similares al MHC no clásicas. Esto activa linfocitos T auxiliares CD4+ específicos de antígeno o linfocitos T citotóxicos CD8+ (los "CTL"). Los CTL tienen especificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por los MHC clásicos y no clásicos y se expresan sobre las superficies de células. Los CTL ayudan a inducir y estimular la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante los linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y enfocan la actividad de células efectoras no específicas frente a células que presentan un péptido u otros antígenos en asociación con moléculas clásicas o no clásicas de MHC en su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo que se producen por parte de linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluyendo las procedentes de linfocitos T CD4+ y CD8+. La capacidad de una composición o antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante una serie de ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, sometiendo a ensayo linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado o mediante la medición de la producción de citocinas por linfocitos T en respuesta a la reestimulación con antígeno. Tales ensayos se conocen bien 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.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") significa una cualquiera o más de lo siguiente: (i) la prevención de infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la gravedad de, o, la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de infección) o terapéuticamente (tras la infección). En la presente divulgación, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con un aspecto particular de la presente divulgación, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunizar de forma profiláctica y/o terapéutica, a un animal hospedador frente a una infección microbiana (por ejemplo, una bacteria tal como *Staphylococcus*). Los procedimientos de la presente divulgación son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los procedimientos de la presente divulgación pueden también ponerse en práctica en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

Tal como se usa en el presente documento, "mamífero" significa un ser humano o animal no humano. Más en particular, mamífero se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportivos y mascotas de compañía tales como una mascota doméstica y otro animal domesticado incluyendo, pero sin limitación, ganado bovino, ovejas, hurones, cerdos, caballos, conejos, cabras, perros, gatos y similares. Los animales de compañía preferidos son perros y gatos. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Una "cantidad inmunogénica" y "cantidad inmunológicamente eficaz", usándose ambas de forma indistinta en el presente documento, se refieren a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para suscitar una respuesta inmunitaria, o bien una respuesta celular (linfocito T) o bien humoral (linfocito B o anticuerpo), o ambas, tal como se mide por ensayos convencionales conocidos por un experto en la materia.

Las cantidades de un conjugado particular en una composición se calculan en general a base del polisacárido total, conjugado y no conjugado, para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado de CP5 con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido CP5 conjugado y aproximadamente 20 mcg de polisacárido CP5 no conjugado en una dosis de polisacárido CP5 de 100 mcg. La contribución de la proteína al conjugado no se considera normalmente cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 mcg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg y más en particular de 1 a 10 mcg. La "cantidad inmunogénica" de los distintos componentes de polisacárido en la composición inmunogénica, puede divergir y cada uno puede comprender 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg o aproximadamente 100 mcg de cualquier antígeno de polisacárido particular.

"Enfermedad invasiva" por *S. aureus* es el aislamiento de bacterias a partir de un sitio normalmente estéril, en que están asociados signos/síntomas clínicos de enfermedad. Los sitios del organismo normalmente estériles incluyen sangre, LCR, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido articular/sinovial, hueso, sitio interno del organismo (ganglio linfático, cerebro, corazón, hígado, bazo, humor vítreo, riñón, páncreas, ovario) u otros sitios normalmente estériles. Las afecciones clínicas que caracterizan a las enfermedades invasivas incluyen bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, choque septicémico y más.

La eficacia de un antígeno como inmunógeno puede medirse o 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 bien midiendo los niveles de actividad de los linfocitos B midiendo los niveles de anticuerpos en circulación específicos para el antígeno en el suero. Una respuesta inmunitaria puede detectarse también midiendo los niveles en suero de anticuerpo específico de antígeno que se induce después de la administración del antígeno, y más específicamente, midiendo la capacidad de los anticuerpos que se inducen de tal forma para potenciar la capacidad opsonofagocítica de glóbulos blancos particulares, tal como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria puede medirse exponiendo el hospedador inmunizado al antígeno que se ha administrado. Por ejemplo, si el antígeno con respecto al que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección que se induce mediante la cantidad inmunogénica del antígeno se mide detectando el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de una exposición de los animales a las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección puede medirse 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 o en las composiciones inmunogénicas multiantígeno o multicomponente variará con respecto a cada uno de los otros componentes y puede determinarse mediante procedimientos conocidos por el experto. Tales procedimientos incluirían procedimientos para medir la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*. En determinadas realizaciones, el término "aproximadamente" significa dentro de un 20 %, preferentemente dentro de un 10 % y más preferentemente dentro de un 5 %.

La divulgación proporciona adicionalmente anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a los conjugados inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 8 de la presente invención. En algunos aspectos, los anticuerpos se generan después de la administración a un sujeto de los conjugados inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 8 de la presente divulgación. En algunos aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos purificados o aislados que se dirigen contra uno o más de los conjugados inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 8 de la presente divulgación. En algunos aspectos, los anticuerpos de la presente divulgación son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente divulgación proporciona adicionalmente moléculas de polinucleótido que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y una célula, línea celular (tal como células de hibridoma u otras líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para la producción recombinante de anticuerpos) o un animal transgénico que produce un anticuerpo o una composición de anticuerpo de la divulgación, usando unas técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

Los anticuerpos o composiciones de anticuerpos de la divulgación pueden usarse en un procedimiento de tratamiento o prevención de una infección, enfermedad o afección estafilocócica asociada con *Staphylococcus* sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales, y el uso de dicho anticuerpo o composición de anticuerpo para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la divulgación pueden ser útiles también para procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, la detección de la presencia o la cuantificación de los niveles de CP5, de CP8 o de un conjugado de los mismos.

Para evaluar la eficacia de una cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento pueden usarse varios modelos animales que se conocen en la técnica. Por ejemplo:

**Modelo murino de septicemia pasivo:** Se inmunizan ratones de forma pasiva por vía intraperitoneal (i.p.) con IgG o anticuerpo monoclonal inmunitario. Los ratones se exponen 24 horas más tarde a una dosis letal de *S. aureus*. La exposición bacteriana se administra por vía intravenosa (i.v. o i.p.) lo que garantiza que cualquier supervivencia puede atribuirse a la interacción *in vivo* específica del anticuerpo con las bacterias. Se determina que la dosis de exposición bacteriana es la dosis que se precisa para conseguir una septicemia letal de aproximadamente un 20 % de los ratones de control no inmunizados. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede llevarse

a cabo mediante análisis de Kaplan-Meier.

Inmunización activa y modelo de exposición: En este modelo, se inmunizan ratones de forma activa por vía subcutánea (s.c.) con un antígeno diana a las 0, 3 y 6 semanas (o un programa similar conocido por los expertos en la técnica) y se exponen a *S. aureus* en la semana 8 (u otro programa similar conocido por los expertos en la técnica) por la vía intravenosa o intraperitoneal. La dosis de exposición bacteriana se calibra para obtener aproximadamente un 20 % supervivencia en el grupo de control a lo largo de un periodo de 14 días. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede llevarse a cabo mediante análisis de Kaplan-Meier.

Modelo de endocarditis infecciosa pasivo: Un modelo de inmunización pasiva para endocarditis infecciosa (EI) provocada por *S. aureus* se ha usado anteriormente para mostrar que ClfA puede inducir una inmunidad protectora. Véase Vernachio y col. (2006) Antmicro. Agents & Chemo. 50:511-518. En este modelo de EI, se usan conejos o ratas para simular infecciones clínicas que incluyen un catéter venoso central, bacteriemia y siembra hematógena a órganos distales. A unos conejos o ratas cateterizados con vegetaciones de válvula aórtica estériles se les administra una única inyección intravenosa de un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para el antígeno diana. Después de 24 horas, los animales se exponen por vía i.v. a cepa de SARM o a cepas estafilocócicas heterólogas. A continuación, 48 horas después de la exposición, las vegetaciones cardíacas, los riñones y la sangre se recolectan y se cultivan. A continuación se mide la frecuencia de infección estafilocócica en las vegetaciones de válvula cardíaca, los riñones y la sangre. En un estudio, cuando los animales se expusieron a o bien MRSE ATCC 35984 o bien SARM PFESA0003, se mostraron reducciones significativas en la velocidad de infección usando o bien la preparación de anticuerpos policlonales o bien el anticuerpo monoclonal frente a ClfA. Véase Vernachio y col., citado anteriormente.

Modelo de endocarditis infecciosa pasivo: El modelo de endocarditis infecciosa se ha adaptado también para estudios de inmunización activa. Se inmunizan conejos o ratas por vía intramuscular (i.m.) con un antígeno diana y se exponen a *S. aureus* dos semanas más tarde a través de la vía i.v.

Modelo de pielonefritis: En el modelo de pielonefritis, se inmunizan ratones en las semanas 0, 3 y 6 (o un programa similar conocido por los expertos en la materia) con los antígenos diana. En la semana 8, los animales se exponen mediante, por ejemplo, una inyección por vía i.p. de, por ejemplo,  $1,7 \times 10^8$  ufc de PFESA0266 de *S. aureus*. Después de 48 horas, los riñones y/u otros tejidos se recolectan y se cultivan. Por último, se recuentan las unidades formadoras de colonias de las bacterias de exposición en los riñones y/o en otros tejidos. Este modelo evalúa la diseminación sistémica en el animal.

Comprobación de anticuerpos funcionales usando ensayos de destrucción opsonofagocítica

Pueden usarse para este ensayo células efectoras diferenciadas a partir de una línea celular (por ejemplo, las HL60) o células polimorfonucleares (las PMN) aisladas de sangre de donante humano usando la disolución LYMPHOLYTE®-poli (Cedarlane laboratories limited, Ontario, Canadá), según el protocolo del fabricante. Las células efectoras volvieron a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado que contenía un 1 % de albúmina de suero bovino) a una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^7$  células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que estuvieron listas para su uso. Se cultivó la cepa de *S. aureus* PFESA0266 durante la noche sobre unas placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en tampón de ensayo que contenía un 5 % de glicerol a una  $DO_{600} = 1$ , lo que es igual a una concentración de aproximadamente  $5 \times 10^8$  ufc/ml. Se congelaron y se almacenaron a -40 °C alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de  $10^6$  ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando unas placas de polipropileno de 96 pocillos profundos de 1 ml estériles. Se prepararon diluciones en serie con factor 2 de muestras de anticuerpo (50 µl), a lo que siguió la adición de 300 µl de tampón de ensayo a la mezcla de anticuerpos. Se añadieron bacterias (50 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos. La etapa de opsonización fue seguida de la adición de 50 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, se añadieron 50 µl de células efectoras (concentración de  $10^7$  células/ml) a la placa y la suspensión se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Una alícuota de 50 µl de la suspensión se diluyó en serie con factor 10 en una disolución de saponina al 1 % estéril, se sometió a agitación vorticial para minimizar la agregación bacteriana y se sembró en placas en agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1 hora con mezcla continua usando un agitador de tipo giratorio. Al final de la incubación, una alícuota de 50 µl de suspensión se diluyó en serie con factor 10 en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación vorticial para minimizar la agregación bacteriana y sembró en placas de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la proporción del número de ufc que sobrevivieron a los 60 minutos en los pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células efectoras con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero que contenían bacterias, complemento y células efectoras. Se incluyeron controles que contenían bacterias, complemento y sueros para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la agregación.

Adsorción de complemento

El suero de donantes humanos adsorbido frente a las cepas de *S. aureus* PFESA0266, PFESA0286 y PFESA0270

puede usarse como una fuente de complemento en el ensayo. Se cultivaron las cepas de *S. aureus* durante la noche sobre placas de TSA a 37 °C. Las células se rasparon de la placa y se volvieron a suspender en PBS estéril. Las células bacterianas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sedimento celular volvió a suspenderse en suero humano para su adsorción. El suero se incubó con bacterias en un nutador a 4 °C durante 30 minutos. Las células se centrifugaron, el suero se transfirió a otro tubo que contenía bacterias y la etapa de adsorción se repitió de nuevo durante 30 minutos. Por último, las células se centrifugaron y el suero se pasó a través de un filtro de 0,2 micrómetros antes de congelar alícuotas 0,5 ml en nitrógeno líquido.

#### Procedimiento II - OPA usando células HL-60

Las células HL-60 se diferenciaron de acuerdo con S. Romero-Steiner, y col., Clin Diagn Lab Immunol 4 (4) (1997), pág. 415-422. Las células HL-60 recolectadas volvieron a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado que contenía un 1 % de seroalbúmina bovina) a aproximadamente  $10^8$  células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que estuvieron listas para su uso. Se cultivó *S. aureus* durante la noche sobre placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en tampón de ensayo que contenía un 5 % de glicerol a una  $DO_{600} = 1$ , lo que es igual a aproximadamente  $5 \times 10^8$  ufc/ml. Se congelaron y se almacenaron a -40 °C alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de  $10^6$  ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando placas de polipropileno de 96 pocillos profundos de 1 ml estériles. Se prepararon diluciones en serie con factor dos de muestras de anticuerpo monoclonal (25 µl), a lo que siguió la adición de 150 µl de tampón de ensayo a la suspensión de anticuerpos. Se añadieron bacterias (25 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos seguido por la adición de 25 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, se añadieron a la placa 25 µl de células HL-60 ( $10^7$  células/ml) y la suspensión se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Una alícuota de 25 µl de la suspensión se diluyó en serie con factor 10 en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación vorticial para minimizar la agregación bacteriana y se sembró en placas de agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1 hora con un mezclado continuo usando un agitador de tipo bandeja giratoria. Al final de la incubación, una alícuota de 25 µl de suspensión se diluyó en serie con factor 10 en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación vorticial y se sembró en placas de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la proporción del número de ufc que sobrevivieron a los 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero que contenía bacterias, complemento y células HL-60. Se incluyeron controles que contenían bacterias, complemento y Acn para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la agregación.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, no a modo de limitación.

#### Ejemplos

##### **Ejemplo 1: Preparación de polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus*.**

En el presente ejemplo, se describe la producción de diversos intervalos de tamaño de polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus*. La estructura de la unidad de repetición de polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* se muestra en la figura 1. Los procedimientos que se describen en el presente documento son eficaces para producir polisacárido capsular de serotipo 8 con pesos moleculares que varían de aproximadamente 20 kDa a 700 kDa. Mediante una selección apropiada de las condiciones, pueden aislarse y purificarse polisacáridos capsulares de serotipo 8 de alto peso molecular que varían de 50 kDa a 700 kDa en peso molecular. Para su uso en composiciones inmunogénicas, el polisacárido capsular de serotipo 8 puede aislarse y purificarse variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular y muchos intervalos deseados. Para la producción de polisacárido capsular de serotipo 8 se usaron las cepas PFESA0005 o PFESA0286 sobre la base de las características de crecimiento y a la cantidad de cápsula que se produce. Las cápsulas aisladas a partir de las cepas PFESA0005 o PFESA0286 mostraron que eran idénticas.

Para la producción de polisacáridos capsulares de serotipo 8, se cultivaron las cepas en un medio complejo que consistía principalmente en una fuente de carbono (o bien lactosa o bien sacarosa), harina de soja hidrolizada como fuente de nitrógeno y oligoelementos metálicos. Se cultivaron las cepas en biorreactores durante de 2 a 5 días.

Antes del tratamiento en autoclave, se retiró una muestra para someter a prueba el nivel de la enterotoxina estafilocócica B (SEB, forma siglada de *Staphylococcal enterotoxin B*) en el cultivo. En presencia de un 0,05 % de Polisorbato 80, la concentración de SEB en la fermentación fue de 15-20 ng/ml. Experimentos previos mostraron que el tratamiento en autoclave del cultivo durante 1 hora redujo el nivel de SEB a menos de 0,1 ng/ml, lo que se encuentra por debajo del límite de detección para el kit TECRA.

Se cargó en una columna de Q-Sepharose AEC el polisacárido fraccionado en etanol, diafiltrado y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl tal como se describe anteriormente. Las fracciones se analizaron mediante el ensayo de O-Acetilo y una prueba de doble inmunodifusión para determinar la presencia de polisacárido de serotipo 5, y un ensayo de fosfato para determinar la presencia de ácido teicoico (TA, forma siglada de *teichoic acid*). La presencia

de polisacárido de serotipo 8 se detectó en las fracciones 35 a 95 (las figuras 2A-B).

Para reducir la contaminación con ácido teicoico, las fracciones 35 a 75 se agruparon y cualquier ácido teicoico residual se oxidó con metaperyodato de sodio para permitir su eliminación mediante diafiltración de 3K frente a diH<sub>2</sub>O.

5 La purificación de polisacárido capsular de serotipo 8 que se usa para la preparación de conjugados se realizó mediante dos procedimientos diferentes que se basan en una temperatura elevada y en un pH bajo para afectar a la liberación de cápsula a partir de la célula y reducir el peso molecular del polisacárido. El peso molecular resultante dependía del tiempo, la temperatura y el pH de la etapa de hidrólisis.

10 La caracterización del polisacárido capsular de serotipo 8 se realizó usando las técnicas que se especifican en la tabla 1.

**Tabla 1: Ensayos de caracterización para polisacáridos capsulares de serotipo 8 de *S. aureus* purificados.**

<b>Especificidad</b>	<b>Ensayo</b>
Proteína residual	ensayo colorimétrico de Lowry
Ácidos nucleicos residuales	análisis a 260 nm
Ácido teicoico residual	ensayo colorimétrico de fosfato
Peptidoglucano residual	HPAEC-PAD
Tamaño	SEC-MALLS
Composición	HPAEC-PAD
Identidad	1H-RMN o reacción con Acm específico
O-acetilación	1H-RMN
Concentración	MALLS-RI o HPAEC-PAD

15 Los polisacáridos de cápsula que se producen mediante los procedimientos que se describen a continuación dan como resultado polisacáridos puros bien caracterizados con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico, peptidoglucano y ácido teicoico.

20 En el primer procedimiento, después de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, la preparación se trató con un cóctel de enzimas (por ejemplo, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, lisozima y proteasa) para digerir impurezas. Después de la incubación, las impurezas residuales se precipitan mediante la adición de etanol (concentración final de aproximadamente un 25 %). Después de la eliminación del etanol residual, una disolución que contenía polisacárido de cápsula se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y se eluyó con un gradiente de sal lineal. Las fracciones que contenían polisacárido de cápsula se agruparon y se trataron con metaperyodato de sodio. Este tratamiento dio como resultado la hidrólisis oxidativa del contaminante de ácido teicoico residual, pero no afectó al polisacárido capsular de serotipo 8. La reacción se desactivó mediante la adición de etilenglicol. El material se concentró y se sometió a diafiltración frente a dH<sub>2</sub>O para eliminar cualquier producto secundario y reactivo residual.

25 El segundo procedimiento se usó para producir polisacárido de cápsula sin el uso de enzimas para digerir las diversas impurezas procedentes de las células. En el presente procedimiento, después de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, el caldo de fermentación hidrolizado se clarificó por microfiltración seguida por ultrafiltración y diafiltración. La disolución se trató con carbono activado para eliminar impurezas. Después del tratamiento con carbono, el material se trató con metaperyodato de sodio para oxidar el ácido teicoico residual seguido por una desactivación con propilenglicol. El material se concentró y se sometió a diafiltración frente a dH<sub>2</sub>O para eliminar cualquier producto secundario y reactivo residual.

30 Las preparaciones que se producen usando cualquiera de los procedimientos dieron como resultado polisacáridos capsulares puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico y ácido teicoico. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir intervalos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular deseados variando las condiciones de hidrólisis. En la tabla 2 a continuación se muestran ejemplos de polisacárido capsular que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Los lotes de polisacárido capsular de serotipo 8 purificado tenían una alta pureza tal como se indica por la ausencia de ácido teicoico (TA), peptidoglucano y a una proteína residual baja. Véase la tabla 2. El intervalo de pesos moleculares más bajos abarcaba de 20,4 kDa a 65,1 kDa y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados (~100 %). Los niveles de contaminación con ácido nucleico eran bajos (0,12-2,45 %).

**Tabla 2: Caracterización de las preparaciones de polisacárido capsular de serotipo 8.**

<b>Muestra</b>	<b>CP8 purificado total</b>	<b>PM</b>	<b>Proteína</b>	<b>Ácido Nuc.</b>	<b>O-Acetilo</b>
	mg	(kDa)	(Lowry)	(análisis a 260 nm)	RMN
		(g/mol)	% (p/p)	% (p/p)	%
1	310	27,0	1,2	0,94	100
2	438	29,0	2,4	2	100
3	179	20,4	0,37	0,12	108

*Selección del peso molecular de los polisacáridos capsulares:* Un análisis cinético mostró que puede generarse un amplio intervalo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Inicialmente, se produjeron unos polisacáridos más grandes mediante las células bacterianas y posteriormente se seleccionó un intervalo de peso molecular deseado, y a continuación se purificó mediante la manipulación del pH y las condiciones de calor de las etapas de calentamiento y de hidrólisis.

El tratamiento térmico del caldo de fermentación de *S. aureus* es una etapa de procedimiento entre la fermentación y la recuperación de polisacárido capsular. Esta etapa de procedimiento usa calor para tratar el caldo de pH ajustado durante un periodo especificado. Los fines del tratamiento térmico a un pH bajo eran destruir células, inactivar enterotoxinas, liberar polisacárido unido a la célula y reducir el peso molecular al tamaño deseado. Entre estos fines, la reducción de peso molecular era el más lento en términos de tiempo de procesamiento necesario en esta etapa. Por lo tanto, los otros fines se lograron inevitablemente dentro del tiempo de tratamiento considerado.

*Tratamiento térmico:* se determinaron las condiciones de pH y temperatura para seleccionar diversos intervalos de peso molecular de los polisacáridos de cápsula. Para estos estudios se usó un fermentador Biolafitte de 15 l. El caldo de fermentación se transfirió al fermentador mediante una bomba peristáltica. El pH del caldo se ajustó con ácido sulfúrico concentrado usando una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm. A continuación, la temperatura del caldo se elevó hasta el valor fijado. El tiempo de tratamiento térmico empezó en cuanto la temperatura alcanzó el punto fijado. Cuando se alcanzó el tiempo de tratamiento deseado, el caldo se enfrió hasta temperatura ambiente. Se tomaron muestras durante el procedimiento para determinar la concentración de polisacárido y el peso molecular mediante sistemas de HPLC y SEC-MALLS, respectivamente. Los datos del peso molecular (PM) se usaron en el análisis cinético. Los perfiles de PM se determinaron a lo largo del tiempo a un pH de 3,5, 4,0 y 5,0. Véase la figura 3A.

La cinética de hidrólisis ácida suave de los polisacáridos se realizó usando polisacárido capsular de serotipo 8 purificado que se obtiene a partir del procedimiento. La disolución de polisacárido purificado se ajustó al pH deseado para el experimento con ácido sulfúrico. Aproximadamente 1,5 ml de la disolución se transfirieron a cada uno de los tubos de centrifuga de 15 ml. Se colocaron los tubos en un baño de aceite equipado con un sistema de control de la temperatura de precisión. El tubo se retiró a un intervalo de tiempo predeterminado y se desactivó en un cubo de hielo. Al final del experimento, se añadió a la muestra una alícuota de tampón Tris 1 M (pH 7,5) para ajustar el pH de nuevo a aproximadamente 7. Las muestras se analizaron mediante un sistema SEC-MALLS. Los datos de PM se usaron en el análisis cinético. Se determinó a lo largo del tiempo el efecto de la temperatura sobre el perfil de PM de CP8 a un pH de 3,5. Véase la figura 3B.

### Resultados

Tal como se muestra en la figura 3A, un pH más bajo era más eficaz para reducir el peso molecular del polisacárido. Pueden generarse pesos moleculares de entre 300 kDa y 600 kDa usando un pH de 5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. Asimismo, pueden generarse pesos moleculares de entre 250 kDa y 450 kDa usando un pH de 4 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. Además, pueden generarse pesos moleculares de entre 120 kDa y 450 kDa usando un pH de 3,5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos.

Tal como se muestra en la figura 3B, cuanto más alta es la temperatura, más rápida es la velocidad de hidrólisis y más amplio es el intervalo de los pesos moleculares de polisacárido que se produce con el tiempo. El uso de una temperatura más baja, 55 °C frente a 95 °C al mismo pH, produce un intervalo más estrecho de pesos moleculares del polisacárido.

Además, la figura 4 demuestra una correlación entre el peso molecular de CP8 purificado con el tiempo de tratamiento para la hidrólisis ácida suave (pH 3,5 a 95 °C). El polisacárido purificado es el producto final que se obtiene a partir del procedimiento de recuperación detallado anteriormente. Como también se muestra en la figura 4, un aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa *S. aureus* PFESA0005 a un pH de 3,5 dio como resultado CP8 de peso molecular más bajo, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a un pH de 3,5 dieron como resultado CP8 de peso molecular más alto. El tamaño de los polisacáridos capsulares de serotipo 8 variaba de aproximadamente 80 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a un pH de 3,5. La correlación entre el tiempo de tratamiento térmico a un pH bajo y el tamaño del CP8 purificado, tal como se muestra en la figura 4, permite una estimación del tiempo de tratamiento necesario para producir polisacárido purificado con un intervalo especificado de peso molecular.

Es importante indicar que, tal como se muestra anteriormente, puede producirse, liberarse y purificarse el intervalo completo de pesos moleculares de polisacáridos capsulares de serotipo 8 de 20 kDa a más de 500 kDa. Por lo tanto, los procedimientos pueden usarse para producir intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados tal como se muestra en la tabla 3. El intervalo relativamente estrecho de peso molecular de polisacárido que se produce cuando los pesos moleculares máximos varían de 87 kDa a 108 kDa representa un intervalo bien caracterizado de pesos moleculares que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Un intervalo particularmente ventajoso de polisacáridos de alto peso molecular, que varía de 70 kDa a 300 kDa o de 70 kDa a 150 kDa, es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando el polisacárido capsular con una proteína o molécula transportadora (véase la tabla 3). Las condiciones

que se usan para generar el polisacárido de cápsula CP8 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 80 a 120 kDa son las siguientes: 95 °C, pH 3,5 durante 300 minutos.

**Tabla 3: Producción de un intervalo específico de polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular.**

Serie	PM (kDa) del polisacárido capsular de serotipo 8
1	98
2	89
3	108
4	108
5	89
6	100
1	99
2	113
3	105
4	100
5	87

5

### Ejemplo 2: Conjugación de polisacáridos capsulares de serotipo 8 con CRM<sub>197</sub>.

El presente ejemplo describe procedimientos y ensayos de caracterización que se usan en la producción de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus*-CRM<sub>197</sub>. Se desarrollaron diferentes químicas de conjugación para conjugar polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* con esta proteína transportadora. Por ejemplo, la conjugación usando PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida) da como resultado un enlace tioéter covalente entre el CP (forma siglada de *capsular polysaccharide*: polisacárido capsular) y la proteína transportadora. Alternativamente, la conjugación usando CDI/CDT (1,1-carboildiimidazol/1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) da como resultado un enlazador de un carbono o de cero carbonos entre el CP y la proteína transportadora.

#### *Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 con CRM<sub>197</sub> mediante química de conjugación de PDPH.*

La química de conjugación de PDPH es un procedimiento de múltiples etapas que implica la activación del polisacárido, la eliminación del grupo protector de tiol, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación de la proteína CRM<sub>197</sub> y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. Después de la introducción de un enlazador que contenía grupos tiol en el polisacárido y un grupo haloacetilo en el transportador de proteína CRM<sub>197</sub>, el polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* se unió al transportador de proteína a través de un enlace tioéter. Se introdujeron grupos bromoacetilo en la proteína CRM<sub>197</sub> mediante reacción de grupos amina con N-hidroxisuccinimida éster del ácido bromoacético. Para generar polisacárido tiolado, los grupos carboxilato activados por carbodiimida del ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido se acoplaron con el grupo hidrazida del enlazador heterobifuncional de la hidrazida reactiva con sulfhidrilo 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH). Los tioles de PDPH-polisacárido tiolado, generados mediante reducción con DTT y purificados mediante SEC en una columna Sephadex G25, reaccionaron con los grupos bromoacetilo de la proteína activada dando como resultado una unión covalente de tioéter formada mediante desplazamiento de bromo entre el polisacárido y la proteína transportadora. Los grupos bromoacetilo sin reaccionar se "protegeron" con clorhidrato de cisteamina (clorhidrato de 2-aminoetanol). A continuación se concentró la mezcla de reacción y se sometió a diafiltración. Los grupos bromoacetilo no conjugados restantes se protegieron con clorhidrato de cisteamina para garantizar que no quedaba ningún grupo bromoacetilo reactivo tras la conjugación. Éste formó un enlace covalente entre el extremo de tiol de la cisteamina y el grupo acetilo en el resto de lisina tras el desplazamiento de bromo.

1. *Tiolación de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus con PDPH:* El polisacárido se activó en primer lugar mediante tiolación con PDPH. Se mezcló el polisacárido con una disolución madre de PDPH recién preparada (250 mg/ml en DMSO), una disolución madre de EDAC (90 mg/ml en diH<sub>2</sub>O) y disolución madre de tampón MES (0,5 M, pH 4,85) para preparar la disolución final MES 0,1 M, y 2 y 4 mg de polisacárido/ml mientras se mantiene una proporción en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de 1:0,6:1,25 para el polisacárido capsular de serotipo 8. Se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se dializó frente a un volumen de 1000X de H<sub>2</sub>O destilada cuatro veces usando un dispositivo de diálisis de MWCO de 3500 a entre 4 °C y 8 °C para eliminar PDPH sin reaccionar. El polisacárido unido a PDPH se hizo DTT 0,2 M y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o durante la noche a entre 4 °C y 8 °C. Se separaron el DTT en exceso así como los subproductos de la reacción del sacárido activado mediante SEC usando resina Sephadex G25 y agua destilada como la fase móvil. Las fracciones se sometieron a ensayo mediante el ensayo de DTDP para grupos tiol y se agruparon las fracciones positivas para tiol que eluían cerca del volumen vacío de la columna. Se sometió a ensayo el grupo de fracciones mediante los ensayos de PAHBAH y de O-acetilo para determinar el grado de activación, lo que se expresa como un porcentaje molar de las unidades de repetición que contenían un grupo tiol (concentración molar de tioles/concentración molar de unidades de repetición). Se liofilizó el polisacárido activado y se almacenó a -25 °C hasta que se necesitara para la conjugación.

Los resultados de la reproducibilidad de la tiolación del polisacárido de serotipo 8 con PDPH se muestran en la tabla 4. El grado de activación de polisacárido de serotipo 8 estaba en el intervalo de un 12 % a un 16 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de enlazador unida por diez unidades de repetición de polisacárido capsular con respecto a una molécula de enlazador por cinco unidades de repetición.

5 **Tabla 4: Activación de polisacárido capsular de serotipo 8 con PDPH - Estudio de reproducibilidad.**

Polisacárido de serotipo 8-PDPH	Activación (% de M <sub>SH</sub> /M <sub>UR</sub> )	Escala, mg	Rendimiento, mg (% p/p)
1	14	36	30(83)
2	16	30	27(91)
4	16	38	42(110)
5	12	40	44(110)

10 2. *Activación de la proteína transportadora:* Por separado, se activó la proteína transportadora mediante bromoacetilación. La CRM<sub>197</sub> se diluyó hasta 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM pH 7 (PBS) y a continuación se preparó NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 usando una disolución madre 1 M. El N-hidroxisuccinimida éster del ácido bromoacético (BAANS) se añadió a una proporción de CRM<sub>197</sub>:BAANS de 1:0,25 (p:p) usando una disolución madre de BAANS de DMSO 20 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a entre 4 y 8 °C durante 1 hora, a continuación se purificó usando SEC sobre Sephadex G-25. La CRM<sub>197</sub> activada purificada se sometió a ensayo mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y a continuación se diluyó con PBS hasta 5 mg/ml. Se añadió sacarosa a un 5 % p/vol como un crioprotector y se congeló la proteína activada y se almacenó a -25 °C hasta que se necesitó para la conjugación.

15 La bromoacetilación de restos de lisina de CRM<sub>197</sub> fue muy consistente, dando como resultado la activación de 19 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles (véase la tabla 5). La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

**Tabla 5: Rendimientos y grado de Bromoacetilación de CRM<sub>197</sub>.**

Preparación	Lisinas Activadas (n =)	Escala (mg)	Rendimiento (% p/p)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

20 3. *Reacción de acoplamiento:* Una vez se hubieron preparado el polisacárido de cápsula activado y la proteína transportadora activada, se combinaron los dos en una reacción de conjugación. Se disolvió el polisacárido tiolado y liofilizado en borato 0,16 M pH 8,95, se mezcló con CRM<sub>197</sub> bromoacetilada descongelada y agua destilada para preparar la disolución final de borato 0,1 M, proporción 1:1 p/p de CRM<sub>197</sub>:polisacárido, y polisacárido 1 mg/ml. Se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante entre 16 y 24 horas. Se protegieron los grupos bromoacetilo sin reaccionar en la proteína añadiendo clorhidrato de cisteamina en una proporción de CRM<sub>197</sub>:cisteamina de 1:2 (p/p), usando una disolución madre de cisteamina 135 mg/ml disuelta en borato 0,1 M pH 8,95, y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. El conjugado de polisacárido de cápsula-CRM<sub>197</sub> (conjugado) se purificó por diafiltración 50 veces frente a NaCl al 0,9 % usando un ultrafiltro de polietersulfona de 100K.

30 Los resultados de la reproducibilidad de los estudios de tiolación de polisacárido capsular de serotipo 8 con PDPH demostraron que el grado de activación del polisacárido estaba en el intervalo de un 12 % a un 16 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de enlazador unida por diez unidades de repetición de polisacárido con respecto a una molécula de enlazador por cinco unidades de repetición.

*Conjugación del polisacárido capsular de serotipo 8 con CRM<sub>197</sub> mediante química de conjugación de CDI/CDT.*

35 CDI y CDT permiten un procedimiento de conjugación de una etapa en que el polisacárido se activa en un entorno anhidro (DMSO) para formar fracciones de carbamato de imidazol o triazol con hidroxilos disponibles y fracciones de acilimidazol o aciltriazol con ácidos carboxílicos. La adición de un transportador de proteína (en DMSO) conduce al desplazamiento nucleófilo del imidazol o triazol por lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados).

40 Las químicas de conjugación tanto de CDI como CDT produjeron un polisacárido capsular de serotipo 8 unido covalentemente con la proteína transportadora, lo que se indicaba por la presencia del sacárido y la proteína en las fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño, y mediante análisis de aminoácidos de conjugado protegido con clorhidrato de cisteamina o con glucolaldehído.

El resumen de los resultados de la preparación de varios lotes de conjugados preparados mediante químicas tanto

de PDPH como de CDI/CDT para el serotipo 8 capsular con tamaño de polisacárido en el intervalo de 20 kDa a 40 kDa se muestra a continuación en la tabla 6. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, la proporción de polisacárido-proteína y los rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos de conjugación. La antigenicidad del polisacárido conjugado capsular de serotipo 8 no se vio alterada por la conjugación tal como se representa mediante la banda de precipitinas de identidad entre los conjugados y el polisacárido nativo.

**Tabla 6: Caracterización del polisacárido capsular de serotipo 8-CRM<sub>197</sub> preparado mediante dos químicas de conjugación.**

Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Proporción de producción	Azúcar libre (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificadas	Tamaño (PM o Kd (% < 0,3), sac./prot.))
CDI/CDT	46-62	54-55	0,8-0,9	22-25	< 1	7-8	34/57 a 60/57
PDPH	34-70	61-83	0,6-0,9	15-41	ND	11-16	74-92 %

Tal como se muestra anteriormente, los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para producir intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. Se buscaba preparar conjugados a partir de un intervalo preseleccionado de alto peso molecular que pudiera ser polisacárido capsular de serotipo 8 purificado y filtrado para su uso en composiciones inmunogénicas. La tabla 7 resume el análisis de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 en que el peso molecular del polisacárido de cápsula de serotipo 8 variara de aproximadamente 80 kDa a 120 kDa, y se utilizó la química de conjugación de imidazol. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes variaban de 595 kDa a 1.708 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM<sub>197</sub> variaba de un número alto de 9 a un número bajo de 3. El polisacárido de cápsula libre variaba de un número alto de un 6 % a un número bajo de un 2 %.

**Tabla 7: Conjugados con intervalo de peso molecular preseleccionado de polisacárido capsular de serotipo 8.**

Serie	Poli, PM (kDa)	Rendimiento (%)	Sac. libre (%)	PM mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas modificadas
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

Ambas químicas de conjugación producen un polisacárido capsular de serotipo 8 unido covalentemente con la proteína transportadora. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, la proporción de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína y los rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

### Ejemplo 3: Procedimiento en un solo frasco frente a procedimiento de CDI/CDT complejo.

Tal como se describe anteriormente, los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas transportadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol), CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil hidrazida). El uso de CDI/CDT da como resultado un enlazador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína transportadora, mientras que el uso de PDPH da como resultado un enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína transportadora.

El procedimiento basado en PDPH era un procedimiento de múltiples etapas que implicaba la activación del polisacárido, la eliminación de un grupo tiol protector en el polisacárido, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación del transportador de proteína, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. En el presente procedimiento, se hicieron reaccionar polisacáridos capsulares de serotipo 8 de *S. aureus* con PDPH y una carbodiimida en una disolución acuosa tal como MES 0,1 M para producir polisacáridos unidos a PDPH. Los polisacáridos unidos a PDPH se hicieron reaccionar con un agente reductor para producir polisacáridos activados que se purificaron a continuación. Las proteínas transportadoras se hicieron reaccionar con N-hidroxisuccinimida éster del ácido bromoacético en una disolución acuosa para producir proteínas transportadoras activadas que se purificaron a continuación. Los polisacáridos de serotipo 8 activados purificados se hicieron reaccionar a continuación con las proteínas transportadoras activadas purificadas para producir conjugados de polisacárido de serotipo 8:proteína transportadora.

Por el contrario, los procedimientos basados en CDI y CDT eran procedimientos de conjugación de una o dos etapas, en que el polisacárido capsular se activaba en un entorno anhidro (es decir, DMSO) para formar fracciones

de carbamato de imidazol o de triazol con hidroxilos disponibles y fracciones de acilimidazol o aciltriazo con ácidos carboxílicos. La adición del transportador de proteína (en DMSO) condujo a un desplazamiento nucleófilo del imidazol o triazol por lisina y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Por consiguiente, se desarrollaron dos procedimientos basados en CDI o CDT: un procedimiento más complejo y un procedimiento en un solo frasco más sencillo. En el procedimiento más complejo, se combinaron polisacáridos capsulares de serotipo 8 de *S. aureus* con imidazol o triazol, se liofilizaron, y a continuación se hicieron reaccionar con CDI o CDT en un disolvente orgánico (tal como DMSO) para producir polisacáridos de serotipo 8 activados. Los polisacáridos de serotipo 8 activados se purificaron y a continuación se hicieron reaccionar con proteínas transportadoras en el disolvente orgánico para producir conjugados de polisacárido de serotipo 8-proteína transportadora. El procedimiento en un solo frasco era similar al procedimiento complejo excepto en que los polisacáridos de serotipo 8 activados no se purificaban antes de la reacción con las proteínas transportadoras.

#### Procedimiento complejo de CDI/CDT.

*Activación del polisacárido:* Se mezcló polisacárido de serotipo 8 con 10 g de triazol/g de serotipo 8 y se liofilizó. Se disolvió la torta resultante en DMSO a 2,0 mg de polisacárido de serotipo 8/ml. Se determinó el contenido en agua. Se añadió una disolución madre recién preparada de CDT a 100 mg/ml en DMSO hasta conseguir una cantidad molar de CDT equivalente al agua. Alternativamente, la cantidad de CDT que se añade puede ajustarse para obtener un grado de activación más alto o más bajo. Esto se mantuvo 30 minutos a 23 °C.

*Purificación del polisacárido de serotipo 8 activado:* La disolución de serotipo 8 activado (ACP8) se vertió en 25 volúmenes de agua para destruir el CDT en exceso. Ésta se concentró hasta su volumen original sobre una membrana de PES de 10 kDa a aproximadamente 1 mg/cm<sup>2</sup> y se sometió a diafiltración frente a agua para al menos 10 volúmenes. Esta etapa se completó en menos de 4 horas. Se mezcló el material diafiltrado con 10 g de triazol/g de polisacárido de serotipo 8 original y se liofilizó.

*Preparación de CRM liofilizada:* la CRM se sometió a diafiltración frente a NaCl al 0,4 %/sacarosa al 5 % a volumen constante sobre una membrana de PES de 10 kDa para al menos 10 volúmenes. La concentración de proteína se determinó y se añadió suficiente tampón de diafiltración para llevar la concentración de proteína hasta 5,0 g/l, proporcionando de este modo una proporción en p/p de NaCl/CRM = 0,8. Se liofilizó la CRM.

*Conjugación:* Se disolvió polisacárido de serotipo 8 activado, diafiltrado, en DMSO a 1 mg/ml. Se añadió disolución de borato a 100 mM para conseguir un 2 % v/v.

La CRM volvió a suspenderse a 2 mg/ml y, cuando se completó la disolución, se combinó con la disolución de ACP8. Ésta se dejó reaccionar a 23 °C durante 20 horas.

Se vertió la reacción de conjugado en 24 volúmenes de borato 5 mM pH 9,0 y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se ajustó a pH 7,5 con tampón fosfato 0,5 M, pH 6,5. Ésta se filtró a través de un filtro de 5 micrómetros y se concentró hasta el volumen original sobre una membrana de PES de 300 kDa a una carga de ~ 1 mg/cm<sup>2</sup> y se sometió a diafiltración frente a al menos 10 volúmenes de agua. El concentrado resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

#### Procedimiento en un solo frasco de CDI/CDT.

*Intercambio de matriz de CRM<sub>197</sub>:* Se sometió CRM<sub>197</sub> a diafiltración para intercambiar de la matriz voluminosa de aproximadamente fosfato 10 mM/NaCl 80 mM/sacarosa al 15 %, pH 7 a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %/octil-β-D-glucósido 15 mM, pH 7. El intercambio permitió la eliminación de fosfato y sacarosa, que son perjudiciales para la conjugación, y define el contenido en cloruro de sodio llevado a la conjugación. Se añade octil-β-D-glucopiranosido para prevenir la formación de partículas tras la filtración estéril.

La matriz de la CRM<sub>197</sub> se intercambió mediante filtración de flujo tangencial frente a imidazol 5 mM/0,72 %/octil-B-D-glucopiranosido 15 mM pH 7 a través de 10 diavolúmenes usando membranas de PES de MWCO de 10K a una concentración de retentato de aproximadamente 4 mg/ml. La exposición típica de membrana era de 2 gramos/0,092903 m<sup>2</sup> y la concentración de CRM<sub>197</sub> final objetivo en la matriz fue de 6 mg/ml. La CRM<sub>197</sub> se almacenó a 2 °C-8 °C.

*Activación/Conjugación:* El procedimiento de activación/conjugación para polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. aureus* consistió en las siguientes etapas: 1) Intercambio de matriz de la CRM<sub>197</sub>; 2) Combinación del polisacárido; 3) Congelación superficial (*shell freezing*) y liofilización de CRM<sub>197</sub> y polisacárido combinado; 4) Disolución del polisacárido liofilizado y CRM<sub>197</sub>; 5) Activación del polisacárido; 6) Conjugación del polisacárido activado con CRM<sub>197</sub> y 7) Purificación del conjugado (dilución, diafiltración, filtración estéril).

El polisacárido se combinó con 10 gramos de excipiente 1,2,4-triazol por gramo de polisacárido. El excipiente se añadió como un polvo al polisacárido, con una disolución que se obtiene tras menos de 15 minutos de mezclado a temperatura ambiente.

El polisacárido combinado y la CRM<sub>197</sub> se congelaron superficialmente por separado usando un baño de etanol a -75 °C. El volumen por frasco de 1 l era de aproximadamente 500 ml.

5 Para la disolución de polisacárido, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales del polisacárido para obtener una suspensión y a continuación se transfirió al recipiente de reacción de activación/conjugación para calentar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Se obtuvo una disolución transparente a medida que la suspensión alcanzaba aproximadamente 45 °C con mezclado. La disolución se enfrió a continuación hasta 23 °C ± 2 °C.

10 Para la disolución de CRM<sub>197</sub>, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales que contenían CRM<sub>197</sub> para obtener una suspensión y a continuación se transfirió a un segundo recipiente para mezclar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Normalmente, se obtuvo una disolución transparente en menos de 15 minutos.

15 Se obtuvieron muestras de la disolución de polisacárido/DMSO para el análisis de Karl Fischer para determinar el contenido en humedad. Se preparó CDT como una disolución de 100 mg/ml en DMSO y se añadió basándose en el contenido en humedad determinado. La adición continua de la disolución de CDT se realizó a lo largo de aproximadamente 5 minutos a 23 °C ± 2 °C con mezclado. Se dejó avanzar la reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C ± 2 °C. Se obtuvieron muestras de la reacción para determinar el nivel de activación (UV 220/205 nm) y a continuación se añadió borato de sodio 100 mM, pH 9 hasta obtener una disolución acuosa al 1,5 %. A continuación se agitó la disolución de reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C ± 2 °C.

20 Para la conjugación del polisacárido activado con CRM<sub>197</sub>, se añadió DMSO hasta alcanzar una concentración de reacción de 0,8 mg/ml. La CRM<sub>197</sub> disuelta en DMSO se añadió a continuación a la disolución de polisacárido activado con mezclado. Se agitó la reacción durante un mínimo de 4 horas a 23 °C ± 2 °C.

25 La disolución de reacción se diluyó 10X mediante su adición en tetraborato de sodio 5 mM, pH 9 con mezclado para hidrolizar grupos residuales de activación. La disolución diluida se pasó a través de un filtro de 5 m y se concentró hasta una concentración de retentato objetivo de 2 g/l. Se realizó filtración de flujo tangencial usando membranas de celulosa regeneradas de 300K a través de 20 diavolumenes con succinato 5 mM, pH 7. La exposición de membrana típica fue de 1 gramo/0,092903 m<sup>2</sup>. El conjugado purificado se pasó a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

**Ejemplo 4: Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 usando el procedimiento de conjugación en un solo frasco y el complejo.**

30 El presente ejemplo demuestra que el intervalo preseleccionado de pesos moleculares de los polisacáridos de cápsula puede usarse para conjugación o bien en el procedimiento en un solo frasco o bien el complejo. Las células bacterianas producen inicialmente los polisacáridos más grandes y el intervalo de peso molecular purificado resultante puede controlarse mediante el pH y el calor del procedimiento de hidrólisis del ejemplo 1 (tal como se muestra en la tabla 3).

35 En el presente ejemplo, se seleccionaron ocho lotes en que el peso molecular del polisacárido de cápsula de serotipo 8 variaba de aproximadamente 80 kDa a aproximadamente 120 kDa y se realizó la conjugación usando activación con 1,1-carbonil-di-(1,2,4-triazol) para el polisacárido capsular de serotipo 8. Véase la tabla 8. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes variaban de 595 kDa a 1.708 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM variaba de un número alto de 13 a un número bajo de 3. El azúcar libre variaba de un número alto de un 11 % a un número bajo de un 1 %.

40 **Tabla 8: Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 preparados con polisacáridos capsulares de 80 kDa a 120 kDa.**

Procedimiento	Serie	Poli, PM (kDa)	Rendimiento de sac. (%)	Azúcar libre (%)	PM mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas
En un solo frasco	1	98	86	1	751	11
	2	89	80	1	675	13
	3	108	76	4	1.073	5,0
	4	108	69	4	819	5,2
	5	89	85,1	8	1.708	10
	6	100	94,0	11	1.577	5
Complejo	1	99	88	6	943	4
	2	113	73	5	841	3
	3	105	79	3	719	7
	4	100	86	2	630	9
	5	87	90	3	595	6

**Ejemplo 5: Evaluación del polisacárido capsular de serotipo 8 conjugado tratado con base y nativo en un modelo de bacteriemia murino.**

La importancia de los grupos O-acetilo presentes en el polisacárido capsular de serotipo 8 nativo antes de la conjugación para la inducción de respuestas de anticuerpos funcionales se evaluó para los conjugados de polisacárido capsular. El polisacárido capsular de serotipo 8 se O-acetiló en condiciones básicas suaves, y tanto una RMN como una cromatografía iónica (CI) confirmaron la ausencia de O-acetilación en el polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM. El conjugado de CP8 des-O-Ac-CRM se preparó mediante conjugación de polisacárido CP8 des-O-Ac con CRM mediante química de PDPH, tal como se describe en el ejemplo 2.

El conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 no mostró inesperadamente grupos acetilo medibles mediante el procedimiento de CI. Esto podría atribuirse a diferencias en la estructura, sitios de O-acetilación en comparación con otros polisacáridos capsulares de *S. aureus*, lo que a su vez podría provocar la eliminación o modificación de los grupos acetilo en polisacáridos capsulares de serotipo 8 durante la conjugación.

El modelo de bacteriemia murino se usó para evaluar la eficacia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo frente al tratado con base conjugado con CRM<sub>197</sub>. Grupos de ratones BALB/c hembra (15/grupo) se vacunaron en las semanas 0, 3 y 6 con 1 mcg de polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM o 1 µg de polisacárido capsular de serotipo 8 O-Ac-CRM. Las vacunas se formularon con 22 mcg de AIPO<sub>4</sub>. Los animales se expusieron a *S. aureus* PFESA0003, y se contaron las bacterias de la sangre tres horas más tarde. Los datos mostraron que hubo una reducción estadísticamente significativa (p = 0,0362) de las ufc bacterianas recuperadas de la sangre de animales inmunizados con conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo sin tratar tal como se determina mediante la prueba de la t de Student (Tabla 9). En animales que se inmunizaron con conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 tratado con base, las ufc bacterianas recuperadas de sangre fueron similares al grupo de control de solución salina.

**Tabla 9: El conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM<sub>197</sub> reduce la bacteriemia provocada por *S. aureus* PFESA0003 en ratones.**

Antígeno	Cepa/Dosis	Log de UFC/Sangre	Significación (valor p)
Solución salina		4,35	
CP8 des-O-Ac-CRM	PFESA0003	4,45	
CP8 O-Ac-CRM	1,14 x 10 <sup>8</sup>	3,93	0,03

**Ejemplo 6: Evaluación del polisacárido capsular de serotipo 8 nativo y tratado con base conjugado en un modelo de bacteriemia murino.**

Se evaluaron conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 en cuanto a su capacidad para proteger a ratones en un modelo de pielonefritis. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición a *S. aureus* i.p. se redujeron significativamente en comparación con controles inmunizados con PBS.

Se llevaron a cabo dos estudios para evaluar la eficacia del conjugado de CP8-CRM<sub>197</sub> en el modelo de bacteriemia murino, que se describe anteriormente, después de una exposición a *S. aureus* PFESA0268 (tipo 8). El primer estudio (figura 5) mostró una reducción significativa de la bacteriemia (p = 0,0308). Para el estudio, grupos de ratones Swiss Webster de 6-8 semanas de edad (n = 30) se inmunizaron de forma activa mediante inyección subcutánea con 1 µg de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM<sub>197</sub> y solución salina, ambos formulados con 100 µg de AIPO<sub>4</sub> a las 0, 2 y 4 semanas y se expusieron en la semana 6 por vía intravenosa a *S. aureus* PFESA0268 (tipo 8). Se realizaron experimentos de exposición anteriores para optimizar la dosis de la cepa de exposición a la edad de los ratones después de tres vacunaciones. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia se llevó a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

**Ejemplo 7: Actividad opsónica de sueros de ratones inmunizados con Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 nativos y modificados químicamente.**

Se compararon sueros de ratón seleccionados (n = 5) con altos títulos para polisacárido capsular de serotipo 8 de un estudio de vacunación para determinar la actividad opsónica usando la cepa PFESA0005. Los resultados del OPA (tabla 10) muestran que sólo los conjugados preparados mediante la conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo suscitaban anticuerpos opsónicos en los ratones. Cabe destacar que el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 des-OAc era inmunogénico en ratones pero que los anticuerpos suscitados no eran opsónicos en este ensayo. Los títulos de OPA se informan como la inversa de la dilución a la que se observó una destrucción del 40 %.

**Tabla 10: Actividad opsónica de sueros de ratón inmunizado con polisacárido capsular de serotipo 8 nativo frente a polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM.**

Polisacárido capsular de serotipo 8 Des-O-Ac-CRM		Polisacárido capsular de serotipo 8-CRM	
sueros sem. 0, título OP	sueros sem. 8, título de OP	sueros sem. 0, título OP	sueros sem. 8, título de OP

(continuación)

Polisacárido capsular de serotipo 8 Des-O-Ac-CRM		Polisacárido capsular de serotipo 8-CRM	
< 50	< 50	50	150
< 50	< 50	< 50	1.350
< 50	< 50	< 50	450
< 50	< 50	< 50	1.350
< 50	< 50	< 50	4.050

**Ejemplo 8: La destrucción de cepas de *S. aureus* por antisueros para conjugado de serotipo 8 puede inhibirse mediante la adición de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo.**

- 5 Para confirmar la especificidad de la destrucción, se realizó el ensayo opsonofagocítico en presencia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo o polisacárido neumocócico no relacionado (poli Pn 14), esencialmente tal como se describe anteriormente.

Los resultados (tabla 11) mostraron que la presencia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo en la mezcla de reacción inhibía la destrucción opsonofagocítica de *S. aureus* PFESA0286 (tipo 8). Estos resultados confirman que la destrucción opsonofagocítica mediante sueros inmunitarios está mediada por anticuerpos específicos de cápsula.

**Tabla 11: La adición de polisacárido capsular de serotipo 8 inhibe la destrucción opsonofagocítica de *S. aureus* por sueros inmunitarios.**

Mono	Muestra de sueros	Título de OPA
02D133	Sem. 0	< 50
	Sem. 8	4.050
	Sem. 0 + poli CP8 20 µg	< 50
	Sem. 8 + poli CP8 20 µg	< 50
(continuación)		
Mono	Muestra de sueros	Título de OPA
A4N122	Sem. 0 + poli Pn14 20 µg	< 50
	Sem. 8 + poli Pn14 20 µg	4.050
	Sem. 0	< 50
	Sem. 8	4.050
	Sem. 0 + poli CP8 20 µg	< 50
	Sem. 8 + poli CP8 20 µg	< 50
	Sem. 0 + poli Pn14 20 µg	< 50
	Sem. 8 + poli Pn14 20 µg	1.350

## RESUMEN

- 15 Todas las químicas de conjugación produjeron polisacárido capsular de serotipo 8 unido covalentemente con la proteína transportadora CRM<sub>197</sub>. No hubo diferencias significativas en el sacárido libre, la proporción de polisacárido capsular de serotipo 8:proteína y los rendimientos de los conjugados generados mediante estos procedimientos.

**Ejemplo 9: Preparación de polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus*.**

- 20 En el presente ejemplo, se describe la producción de diversos intervalos de tamaño de polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus*. La estructura de la unidad de repetición de polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus* se muestra en la figura 6. Los procedimientos que se describen en el presente documento son eficaces para producir polisacárido capsular de serotipo 5 con pesos moleculares que varían de aproximadamente 20 kDa a 800 kDa. Mediante una selección apropiada de las condiciones, pueden aislarse y purificarse polisacáridos capsulares de serotipo 5 de alto peso molecular que varían de 50 kDa a 800 kDa en peso molecular. Para su uso en composiciones inmunogénicas, puede aislarse y purificarse polisacárido capsular de serotipo 5 que varía de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular, de 70 kDa a 150 kDa, y muchos otros intervalos deseados. La cepa PFESA0266 se seleccionó para la producción de polisacárido capsular de serotipo 5 a base de las características de crecimiento y a la cantidad de cápsula producida.

- 30 Para la producción de polisacárido capsular de serotipo 5, se cultivó la cepa PFESA0266 en un medio complejo que consiste principalmente en una fuente de carbono (o bien lactosa o bien sacarosa), harina de soja hidrolizada como fuente de nitrógeno y oligoelementos metálicos. Se cultivó la cepa en biorreactores durante de 2 a 5 días.

- 35 La fermentación de la cepa PFESA0266 se llevó a cabo tal como se detalló anteriormente. En el momento de la recogida, la DO<sub>600</sub> del cultivo era de 7,38. El cultivo se trató en autoclave durante 1 hora y tras enfriar, se procesó el cultivo tal como se describe anteriormente para separar las células del material sobrenadante. Se recuperó aproximadamente 1 l de sobrenadante filtrado y concentrado y de células.

Antes del tratamiento en autoclave, se retiró una muestra para someter a prueba el nivel de la enterotoxina estafilocócica B (SEB) en el cultivo. En presencia de un 0,05 % de Polisorbato 80, la concentración de SEB en la fermentación fue de 15-20 ng/ml. Experimentos previos mostraron que el tratamiento en autoclave del cultivo durante 1 hora redujo el nivel de SEB a menos de 0,1 ng/ml, lo que se encuentra por debajo del límite de detección para el kit TECRA.

Un polisacárido fraccionado en etanol, diafiltrado, se cargó en una columna Q-Sepharose AEC y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl tal como se describe anteriormente. Las fracciones se analizaron mediante el ensayo de O-Acetilo y una prueba de doble inmunodifusión para determinar la presencia de polisacárido de serotipo 5 y un ensayo de fosfato para determinar la presencia de ácido teicoico. La presencia de polisacárido de serotipo 5 se detectó en las fracciones 60 a 105 (figuras 7A-7B). Para reducir la contaminación con ácido teicoico, las fracciones 60 a 85 se agruparon y el ácido teicoico residual se oxidó con metaperyodato de sodio para permitir su eliminación mediante diafiltración de 3K frente a diH<sub>2</sub>O.

La purificación de polisacárido capsular de serotipo 5 usada para la preparación de conjugados se realizó mediante dos procedimientos diferentes que se basan en una temperatura elevada y en un pH bajo, para afectar a la liberación de cápsula a partir de la célula y reducir el peso molecular del polisacárido. El peso molecular resultante dependía del tiempo, la temperatura y el pH de la etapa de hidrólisis.

La caracterización del polisacárido capsular de serotipo 5 se realizó usando las técnicas que se especifican en la tabla 1, citado anteriormente.

Los polisacáridos de cápsula producidos mediante los procedimientos que se describen a continuación dan como resultado polisacáridos puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico, peptidoglucano y ácido teicoico.

En el primer procedimiento, después de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, la preparación se trató con un cóctel de enzimas (por ejemplo, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, lisozima y proteasa) para digerir impurezas. Después de la incubación, las impurezas residuales se precipitaron mediante la adición de etanol (concentración final de aproximadamente un 25 %). Después de la eliminación del etanol residual, una disolución que contenía polisacárido de cápsula se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y se eluyó con un gradiente lineal de sal. Las fracciones que contenían polisacárido de cápsula se agruparon y se trataron con metaperyodato de sodio. Este tratamiento dio como resultado la hidrólisis oxidativa del contaminante de ácido teicoico residual, pero no afectó al polisacárido capsular de serotipo 5. La reacción se desactivó mediante la adición de etilenglicol. El material se concentró y se sometió a diafiltración frente a agua destilada (dH<sub>2</sub>O) para eliminar cualquier producto secundario y reactivo residual.

El segundo procedimiento se usó para producir polisacárido de cápsula sin el uso de enzimas para digerir las diversas impurezas procedentes de las células. En el presente procedimiento, después de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción del peso molecular, el caldo de fermentación hidrolizado se clarificó por microfiltración seguida por ultrafiltración y diafiltración. La disolución se trató con carbono activado para eliminar impurezas. Después del tratamiento con carbono, el material se trató con metaperyodato de sodio para oxidar el ácido teicoico residual seguido por una desactivación con propilenglicol. El material se concentró y se sometió a diafiltración frente a dH<sub>2</sub>O para eliminar cualquier producto secundario y reactivo residual.

Las preparaciones que se producen usando cualquiera de los procedimientos dieron como resultado polisacáridos capsulares puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico y ácido teicoico. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular deseados manipulando las condiciones de hidrólisis.

Los ejemplos de polisacárido capsular que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento se muestran a continuación en la tabla 12. Los lotes de polisacárido capsular de serotipo 5 purificado tenían una alta pureza tal como se indica por la ausencia de ácido teicoico (TA), peptidoglucano y proteína residual baja. Véanse las tablas 12 y 13. El intervalo de pesos moleculares abarcaba de 132,7 kDa a 800 kDa y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados, variando de un 90 %-100 %, y estaban un 100 % N-acetilados. Los rendimientos de la purificación del polisacárido capsular de serotipo 5 eran de un 39 % a un 63 %, y el tamaño de polisacárido de serotipo 5 purificado variaba de 35 kDa a 65 kDa (véase la tabla 12). El nivel de contaminación por ácido teicoico (TA) era aceptable y los niveles de proteínas residuales y ácido nucleico estaban también en intervalos aceptables. Los espectros de RMN del polisacárido de serotipo 5 eran idénticos a los informados en la bibliografía.

Tabla 12: Caracterización del polisacárido capsular de serotipo 5.

Muestra	CP5 total		PM	Proteína	Ácido Nuc.	O-acetilo
	purificado	Rendimiento				
	mg	%	(kDa)	(g/mol)	(análisis a 260 nm) % (p/p)	RMN (%)
1	101	39	47	0	0,5	94

(continuación)

Muestra	CP5 total purificado	Rendimiento	PM	Proteína	Ácido Nuc.	O-acetilo
2	91	48	65	1,2	2,5	96
3	578	63	35	2,5	0,7	75

Tabla 13: Caracterización adicional de polisacárido capsular de serotipo 5.

Muestra	PM (kDa)	CP5 (mg/ml)	RMN de O-acetilo (%)	RMN de identidad	RMN de N-acetilo (%)
1	800,1	3,164	100	Pasa	100
2	132,7	1,172	90	Pasa	100
3	335,4	0,975	90	Pasa	100
4	366,8	0,865	90	Pasa	ND

ND = no detectado

5

5 *Selección del peso molecular de los polisacáridos capsulares:* Un análisis cinético demostró que puede generarse un amplio intervalo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Inicialmente, las células bacterianas produjeron polisacáridos más grandes, y posteriormente, puede seleccionarse un intervalo de pesos moleculares deseado y a continuación purificarse mediante la manipulación del pH y las condiciones de calor de las etapas de calentamiento y de hidrólisis.

10 El tratamiento térmico del caldo de fermentación de *S. aureus* es una etapa de procedimiento entre la fermentación y la recuperación de polisacárido capsular. Esta etapa de procedimiento usa calor para tratar el caldo de pH ajustado durante un periodo especificado. Los fines del tratamiento térmico a un pH bajo eran destruir células, inactivar enterotoxinas, liberar polisacárido unido a las células y reducir el peso molecular al tamaño deseado. Entre estos fines, la reducción del peso molecular era la menor en términos del tiempo de procesamiento necesario en esta etapa. Por lo tanto, los otros fines se lograron de forma inevitable dentro del tiempo del tratamiento considerado.

15 *Tratamiento térmico:* se determinaron las condiciones de pH y temperatura para seleccionar diversos intervalos de peso molecular de los polisacáridos de cápsula. Para estos estudios se usó un fermentador Biolafitte de 15 l. El caldo de fermentación se transfirió al fermentador mediante una bomba peristáltica. Usando una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm, el pH del caldo se ajustó con ácido sulfúrico concentrado. A continuación, la temperatura del caldo se elevó hasta el valor fijado. El tiempo de tratamiento térmico empezó en cuanto la temperatura alcanzó el punto fijado. Cuando se alcanzó el tiempo de tratamiento deseado, el caldo se enfrió hasta temperatura ambiente. Se tomaron muestras durante el procedimiento para determinar la concentración de polisacárido y el peso molecular mediante sistemas de HPLC y SEC-MALLS, respectivamente. Los datos del peso molecular (PM) se usaron en el análisis cinético. Se determinaron a lo largo del tiempo los perfiles de PM a un pH de 3,5, 4,0 y 5,0. Véase la figura 8A.

20 La cinética de hidrólisis ácida suave de polisacáridos se realizó usando polisacárido capsular de serotipo 8 purificado que se obtiene a partir del procedimiento. La disolución de polisacárido purificado se ajustó al pH deseado para el experimento con ácido sulfúrico. Aproximadamente 1,5 ml de la disolución se transfirieron a cada uno de los tubos de centrifuga de 15 ml. Se colocaron los tubos en un baño de aceite equipado con un sistema de control de la temperatura de precisión. Los tubos se retiraron a intervalos predeterminados y se desactivaron en un cubo de hielo. Al final del experimento, se añadió a la muestra una alícuota de tampón Tris 1 M (pH 7,5) para ajustar el pH de nuevo a aproximadamente 7. Las muestras se analizaron mediante un sistema SEC-MALLS. Los datos de PM se usaron en el análisis cinético. Se determinó a lo largo del tiempo el efecto de la temperatura sobre el perfil de PM de CP5 a pH de 4,5. Véase la figura 8B.

#### Resultados

35 Tal como se muestra en la figura 8A, un pH más bajo era más eficaz para reducir el peso molecular del polisacárido. En el presente ejemplo, pueden generarse intervalos de pesos moleculares de entre aproximadamente 300 kDa y aproximadamente 600 kDa usando un pH de 5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. Véase la figura 8A. Asimismo, elegir un pH de 4,5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede producir intervalos de peso molecular de polisacárido de entre 200 kDa y 400 kDa. Además, elegir un pH de 4,0 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede producir intervalos de peso molecular de polisacárido de entre 120 kDa y 300 kDa.

40 Tal como se muestra en la figura 8B, cuanto más alta es la temperatura, más rápida es la velocidad de hidrólisis y más amplios son los pesos moleculares del polisacárido que se producen con el tiempo. Expresado de otra forma, el uso de una temperatura más baja, 55 °C frente a 95 °C al mismo pH, produce un intervalo más estrecho de pesos moleculares del polisacárido.

Adicionalmente, la figura 4 demuestra para la hidrólisis ácida suave (pH 4,5 a 95 °C) una correlación entre el peso molecular del polisacárido capsular de serotipo 5 purificado con el tiempo de tratamiento. El polisacárido purificado es el producto final que se obtiene a partir del procedimiento de recuperación detallado anteriormente. Como también se muestra en la figura 4, un aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa de *S. aureus* PFESA0266 a pH 4,5 dio como resultado polisacárido capsular de serotipo 8 de menor peso molecular, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a pH 5 dio como resultado polisacárido capsular de serotipo 5 de mayor peso molecular. El tamaño de polisacáridos capsulares de serotipo 5 variaba de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a pH 4,5. Una correlación entre el tiempo de tratamiento térmico a pH bajo y el tamaño de los polisacáridos capsulares de serotipo 5 purificados, tal como se muestra en la figura 4, permite una estimación del tiempo de tratamiento necesario para producir polisacárido purificado con un intervalo especificado de peso molecular.

Tal como se muestra anteriormente, puede producirse, liberarse y purificarse el intervalo completo de pesos moleculares de 20 kDa a más de 500 kDa de los polisacáridos capsulares de serotipo 5. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados, tal como se muestra en la tabla 14. El intervalo relativamente estrecho de polisacárido de peso molecular que se produce cuando los pesos moleculares máximos varían de 63 kDa a 142 kDa representa un intervalo bien caracterizado de pesos moleculares que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Un intervalo particularmente ventajoso de polisacáridos de alto peso molecular, que varían de 70 kDa a 300 kDa o de 70 kDa a 150 kDa, es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando el polisacárido capsular con una proteína o molécula transportadora. Las condiciones que se usan para generar el polisacárido de cápsula de CP5 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 100 a 140 kDa son las siguientes: 95 °C, pH 4,5 durante 135 minutos. Diferentes combinaciones de pH, temperatura y tiempo, no obstante, generarán también moléculas de CP5 con un intervalo de peso molecular de aproximadamente 100 a 140 kDa.

Tabla 14: Producción de un intervalo específico de polisacárido capsular de serotipo 5 de alto peso molecular.

Serie	PM (kDa) del polisacárido capsular de serotipo 5
1	142
2	108
3	142
4	108
5	ND
6	ND
7	63
8	72
9	74
10	63
11	ND

ND = no realizado

#### Ejemplo 10: Conjugación de polisacáridos capsulares de serotipo 5 con CRM<sub>197</sub>.

El presente ejemplo describe procedimientos y ensayos de caracterización que se usan en la producción de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus*-CRM<sub>197</sub>. Se desarrollaron diferentes químicas de conjugación para conjugar polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus* con esta proteína transportadora. Por ejemplo, la conjugación usando PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil hidrazida) da como resultado un enlace tioéter covalente entre el CP y la proteína transportadora; mientras que la conjugación usando CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) da como resultado un enlazador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína transportadora.

#### Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 con CRM<sub>197</sub> mediante química de conjugación de PDPH.

La química de conjugación de PDPH es un procedimiento de múltiples etapas que implica la activación del polisacárido, la eliminación del grupo protector de tior, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación de la proteína CRM<sub>197</sub> y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. Después de la introducción de un enlazador que contenía un grupo tior en el polisacárido y un grupo haloacetilo en el transportador de proteína CRM<sub>197</sub>, el polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus* se unió al transportador de proteína a través de un enlace tioéter. Se introdujeron grupos bromoacetilo en la proteína CRM<sub>197</sub> mediante reacción de grupos amina con el N-hidroxisuccinimida éster del ácido bromoacético. Para generar

polisacárido tiolado, los grupos carboxilato activados por carbodiimida del ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido se acoplaron con el grupo hidrazida del enlazador heterobifuncional de hidrazida reactiva con sulfhidrilo 3-(2-piridilditio)-propionil hidrazida (PDPH). Los tioles del PDPH-polisacárido tiolado, generados mediante reducción con DTT y purificados mediante SEC en una columna de Sephadex G25, reaccionaron con los grupos bromoacetilo de la proteína activada dando como resultado una unión covalente de tioéter formada mediante desplazamiento de bromo entre el polisacárido y la proteína transportadora. Los grupos bromoacetilo sin reaccionar se "protegeron" con clorhidrato de cisteamina (clorhidrato de 2-aminoetanol). A continuación se concentró la mezcla de reacción y se sometió a diafiltración. Los grupos bromoacetilo no conjugados restantes se protegieron con clorhidrato de cisteamina para garantizar que no quedaban grupos bromoacetilo reactivos tras la conjugación. Éste formó un enlace covalente entre el extremo de tiol de la cisteamina y el grupo acetilo en el resto de lisina tras el desplazamiento de bromo.

1. *Tiolación de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus con PDPH*: El polisacárido se activó en primer lugar mediante tiolación con PDPH. Se mezcló el polisacárido con una disolución madre de PDPH recién preparada (250 mg/ml en DMSO), una disolución madre de EDAC (90 mg/ml en diH<sub>2</sub>O), y disolución madre de tampón MES (0,5 M, pH 4,85) para preparar la disolución final MES 0,1 M, y 2 mg y 4 mg de polisacárido capsular/ml mientras se mantiene una proporción en peso de polisacárido capsular:PDPH:EDAC de 1:5:3 para el polisacárido capsular de serotipo 5. Se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se dializó frente a un volumen 1000X de H<sub>2</sub>O destilada cuatro veces usando un dispositivo de diálisis de MWCO de 3500 a entre 4 °C y 8 °C para eliminar PDPH sin reaccionar. El polisacárido unido a PDPH se hizo DTT 0,2 M y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o durante la noche a entre 4 °C y 8 °C. Se separó el DTT en exceso así como los subproductos de la reacción del sacárido activado mediante SEC, usando resina de Sephadex G25 y agua destilada como la fase móvil. Las fracciones se sometieron a ensayo mediante el ensayo de DTDP para grupos tiol y se agruparon las fracciones positivas para tiol que eluían cerca del volumen vacío de la columna. Se sometió a ensayo el grupo de fracciones mediante los ensayos de PAHBAH y de O-acetilo para determinar el grado de activación, lo que se expresa como un porcentaje molar de las unidades de repetición que contenían un grupo tiol (concentración molar de tioles/concentración molar de unidades de repetición). Se liofilizó el polisacárido activado y se almacenó a -25 °C hasta que se necesitara para la conjugación.

Los resultados de la reproducibilidad de la tiolación del polisacárido de serotipo 5 con PDPH se muestran en la tabla 15. El grado de activación del polisacárido de serotipo 5 estaba en el intervalo de un 11 % a un 19 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de enlazador unida por diez unidades de repetición de polisacárido capsular con respecto a una molécula de enlazador por cinco unidades de repetición.

Tabla 15: Activación de polisacárido capsular de serotipo 5 con PDPH - Estudio de reproducibilidad.

Polisacárido de serotipo 5-PDPH	Activación (% de M <sub>SH</sub> /M <sub>UR</sub> )	Escala, mg	Rendimiento, mg (% p/p)
1	11	23	19,6 (85)
2	13	30	28 (93)
3	19	30	23 (77)
4	15	32	29 (90)

2. *Activación de proteína transportadora*: Por separado, se activó la proteína transportadora mediante bromoacetilación. La CRM<sub>197</sub> se diluyó hasta 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM pH 7 (PBS) y a continuación se hizo NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 usando una disolución madre 1 M. Se añadió N-hidroxisuccinimida éster del ácido bromoacético (BAANS) a una proporción de CRM<sub>197</sub>:BAANS de 1:0,25 (p:p) usando una disolución madre de BAANS de DMSO 20 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a entre 4 y 8 °C durante 1 hora, a continuación se purificó usando SEC sobre Sephadex G-25. El CRM<sub>197</sub> activado purificado se sometió a ensayo mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y a continuación se diluyó con PBS hasta 5 mg/ml. Se añadió sacarosa a un 5 % p/vol como un crioprotector y se congeló la proteína activada y se almacenó a -25 °C hasta que se necesitara para la conjugación.

La bromoacetilación de restos de lisina de CRM<sub>197</sub> fue muy consistente, dando como resultado la activación de 19 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles (véase la tabla 16). La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Tabla 16: Rendimientos y grado de bromoacetilación de CRM<sub>197</sub>.

Preparación	Lisinas activadas (n =)	Escala (mg)	Rendimiento (% p/p)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94

(continuación)

Preparación	Lisinas activadas (n =)	Escala (mg)	Rendimiento (% p/p)
5	23	35	87
6	25	48	104

3. *Reacción de acoplamiento*: Una vez se hubieron preparado el polisacárido de cápsula activado y la proteína transportadora activada, se combinaron los dos en una reacción de conjugación. Se disolvió el polisacárido tiolado y liofilizado en borato 0,16 M pH 8,95, se mezcló con CRM<sub>197</sub> bromoacetilada descongelada y agua destilada para preparar la disolución final de borato 0,1 M, proporción 1:1 en p/p de CRM<sub>197</sub>:polisacárido, y polisacárido capsular de serotipo 5 2 mg/ml. Se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante entre 16 y 24 horas. Se protegieron los grupos bromoacetilo sin reaccionar en la proteína añadiendo clorhidrato de cisteamina en una proporción de CRM<sub>197</sub>:cisteamina de 1:2 (p/p) usando una disolución madre de cisteamina de 135 mg/ml disuelta en borato 0,1 M pH 8,95 y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. El conjugado de polisacárido de cápsula-CRM<sub>197</sub> (conjugado) se purificó mediante diafiltración 50 veces frente a NaCl al 0,9 % usando un ultrafiltro de polietersulfona de 100K.

Los resultados de la reproducibilidad de los estudios de tiolación del polisacárido capsular de serotipo 5 con PDPH demostraron que el grado de activación estaba en el intervalo de un 11 % a un 19 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de enlazador unida por diez unidades de repetición de CP con respecto a una molécula de enlazador por cinco unidades de repetición.

#### Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 con CRM<sub>197</sub> mediante química de conjugación de CDT.

CDT proporciona un procedimiento de conjugación de una etapa en el que el polisacárido se activa en un entorno anhidro (DMSO) para formar restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriaazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición de un transportador de proteína (en DMSO) conduce al desplazamiento nucleófilo del triazol mediante lisinas y formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Se diluye la disolución de reacción 10 veces en una disolución acuosa en preparación para purificación mediante filtración de flujo tangencial.

La química de conjugación de CDT produjo polisacárido capsular de serotipo 5 unido covalentemente con la proteína transportadora, lo que se indicaba por la presencia del sacárido y la proteína en las fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño y mediante análisis de aminoácidos del conjugado protegido con clorhidrato de cisteamina o protegido con glucolaldehído.

A continuación en la tabla 17 se muestra un resumen de los resultados de la preparación de varios lotes de conjugados preparados mediante químicas tanto de PDPH como de CDT para tamaños de polisacárido capsular de serotipo 5 en el intervalo de 20 kDa a 40 kDa. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, la proporción de polisacárido:proteína y los rendimientos de conjugados generados mediante estas químicas de conjugación. La antigenicidad del polisacárido capsular de serotipo 5 conjugado no se vio alterada por la conjugación tal como se representa mediante la banda de precipitinas de identidad entre los conjugados y el polisacárido nativo.

Tabla 17: Caracterización del polisacárido capsular de serotipo 5-CRM<sub>197</sub> preparado mediante dos químicas de conjugación.

Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Proporción de producción	Azúcar libre (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificadas	Tamaño (PM o Kd (% < 0,3), sac./prot.))
CDT	19-27	35	0,5-0,8	10-40	< 1	18-22	38/61 a 76/74
PDPH	26-52	40-99	0,4-1,0	23-50	ND	ND	7,5 x 10 <sup>5</sup> a 2,3 x 10 <sup>6</sup>

ND = no detectado

Tal como se muestra anteriormente, los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para producir intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. Se buscaba preparar conjugados a partir de un intervalo preseleccionado de alto peso molecular que pudiera filtrarse y polisacárido capsular de serotipo 5 purificado para su uso en composiciones inmunogénicas. La tabla 18 resume el análisis de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5, en que el peso molecular del polisacárido de cápsula de serotipo 5 variaba de aproximadamente 92 kDa a aproximadamente 119 kDa y estaba activado con triazol (CDT). Los pesos moleculares de los conjugados resultantes variaban de 1.533 kDa a 2.656. El número de lisinas conjugadas por CRM<sub>197</sub> variaba de un número alto de 22 a un número de bajo 15. El polisacárido de cápsula libre variaba de un número alto de un 18 % a un número bajo de un 11 %.

Tabla 18: Conjugados con un intervalo de peso molecular preseleccionado de polisacárido capsular de serotipo 5.

Serie	PM Poli (kDa)	Rendimiento (%)	Sac. libre (%)	PM mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas modificadas
1	121	63	11	2.130	19
2	92	72	16	1.533	22
3	119	74	14	2.656	15
4	115	63	18	1.911	15

5 Ambas químicas de conjugación producen un polisacárido capsular de serotipo 5 unido covalentemente con proteína transportadora. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, la proporción de polisacárido capsular de serotipo 5:proteína y los rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

#### Ejemplo 11: Procedimientos de CDT complejo frente a en un solo frasco.

10 Tal como se describe anteriormente, los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican la conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas transportadoras usando una química de conjugación que implica CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil hidrazida). El uso de CDT dio como resultado un enlazador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína transportadora, mientras que el uso de PDPH da como resultado un enlazador de cinco carbonos que contiene un enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína transportadora.

15 El procedimiento basado en PDPH era un procedimiento de múltiples etapas que implicaba la activación del polisacárido, la eliminación de un grupo protector de tiol en el polisacárido, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación del transportador de proteína y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. En el presente procedimiento, polisacáridos capsulares de serotipo 5 de *S. aureus* se hicieron reaccionar con PDPH y una carbodiimida en un disolvente orgánico tal como DMSO para producir polisacáridos unidos a PDPH. Los polisacáridos unidos a PDPH se hicieron reaccionar con un agente reductor para producir polisacáridos activados que se purificaron a continuación. Las proteínas transportadoras se hicieron reaccionar con ácido bromoacético en un disolvente orgánico para producir proteínas transportadoras activadas que se purificaron a continuación. Los polisacáridos de serotipo 5 activados purificados se hicieron reaccionar a continuación con las proteínas transportadoras activadas purificadas para producir conjugados de polisacárido de serotipo 5:proteína portadora.

25 Por el contrario, los procedimientos basados en CDT eran procedimientos de conjugación de una etapa, en que el polisacárido capsular se activaba en un entorno anhidro (es decir, DMSO) para formar fracciones de carbamato de triazol con hidroxilos disponibles y fracciones de acilimidazol o aciltriazol con ácidos carboxílicos. La adición del transportador de proteína (en DMSO) condujo a un desplazamiento nucleófilo del imidazol o triazol por lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados), permitiendo de ese modo que proceda la conjugación en "un recipiente". Por consiguiente, se desarrollaron dos procedimientos basados en CDT: un procedimiento más complejo y un procedimiento en un recipiente más sencillo. En el procedimiento más complejo, se combinaron polisacáridos capsulares de serotipo 5 de *S. aureus* con imidazol o triazol y a continuación se hicieron reaccionar con CDT en un disolvente orgánico (tal como DMSO) y aproximadamente un 0,2 % p/v de agua para producir polisacáridos de serotipo 5 activados. Los polisacáridos de serotipo 5 activados se purificaron y a continuación se hicieron reaccionar con proteínas transportadoras en el disolvente orgánico para producir conjugados de polisacárido de serotipo 5:proteína transportadora. El procedimiento en un solo recipiente era similar al procedimiento complejo excepto en que los polisacáridos de serotipo 5 activados no se purificaban antes de la reacción con las proteínas transportadoras.

#### Procedimiento de CDT complejo

40 *Activación del polisacárido capsular de serotipo 5:* Se mezcló polisacárido capsular de serotipo 5 con 10 g de triazol/g de polisacárido capsular de serotipo 5 y se liofilizó. Se disolvió la torta resultante en DMSO a 2,0 mg de polisacárido capsular de serotipo 5/ml. Se determinó el contenido en agua y se ajustó al 0,2 %. Se añadió una disolución madre recién preparada de CDT a 100 mg/ml en DMSO para conseguir una cantidad de CDT en un exceso molar de 20 veces en comparación con la cantidad de CP5. Alternativamente, la cantidad de CDT que se añade puede ajustarse para obtener un grado de activación más alto o más bajo. Esto se mantuvo 30 minutos a 45 23 °C.

50 *Purificación del polisacárido capsular de serotipo 5 activado:* La disolución del polisacárido capsular de serotipo 5 activado (ACP5) se vertió en 25 volúmenes de agua para destruir el CDT en exceso. Ésta se concentró hasta su volumen original sobre una membrana de PES de 10 kDa a aproximadamente 1 mg/cm<sup>2</sup> y se sometió a diafiltración frente a agua para al menos 10 volúmenes. Esta etapa se completó en menos de 4 horas. Se mezcló el material diafiltrado con 10 g de triazol/g de polisacárido de serotipo 5 original y se liofilizó.

*Preparación de CRM liofilizado:* Se sometió CRM a diafiltración frente a NaCl al 0,4 %/sacarosa al 5 % a volumen constante sobre una membrana de PES de 10 kDa para al menos 10 volúmenes. La concentración de proteína se determinó y se añadió suficiente tampón de diafiltración para llevar la concentración de proteína hasta 5,0 g/l, proporcionando de este modo una proporción en p/p de NaCl/CRM = 0,8. Se liofilizó la CRM.

- 5 *Conjugación:* Se disolvió el polisacárido capsular de serotipo 5 activado, diafiltrado, en DMSO a 1 mg/ml. Se añadió disolución de borato a 100 mM para conseguir un 2 % v/v.

La CRM volvió a suspenderse a 2 mg/ml y, cuando se completó la disolución, se combinó con la disolución de ACP5. Ésta se dejó reaccionar a 4 °C durante 20 horas.

- 10 Se vertió la reacción de conjugado en 24 volúmenes de borato 5 mM pH 9,0 y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se ajustó a pH 7,5 con tampón fosfato 0,5 M, pH 6,5. Ésta se filtró a través de un filtro de 5 micrómetros y se concentró hasta el volumen original sobre una membrana de PES de 300 kDa a una carga de ~ 1 mg/cm<sup>2</sup> y se sometió a diafiltración frente a al menos 10 volúmenes de agua. El concentrado resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

Procedimiento en un solo frasco de CDT

- 15 *Intercambio de matriz de CRM<sub>197</sub>:* Se sometió CRM<sub>197</sub> a diafiltración para intercambiar de la matriz voluminosa de aproximadamente fosfato 10 mM/NaCl 80 mM/sacarosa al 15 %, pH 7 a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %/octil-β-D-glucopiranosido 15 mM, pH 7. El intercambio permitió la eliminación de fosfato y sacarosa, que son perjudiciales para la conjugación y define el contenido en cloruro de sodio llevado a la conjugación. Se añade octil-β-D-glucopiranosido para prevenir la formación de partículas tras la filtración estéril. La matriz de la CRM<sub>197</sub> se intercambió mediante filtración de flujo tangencial frente a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %/octil-β-D-glucopiranosido 15 mM, pH 7 a través de 10 diavolúmenes usando membranas de PES de MWCO de 10K a una concentración de retentato de aproximadamente 4 mg/ml. La exposición de membrana típica fue de 2 gramos/0,092903 m<sup>2</sup> y la concentración de CRM<sub>197</sub> final objetivo en la matriz era de 6 mg/ml. La CRM<sub>197</sub> se almacenó a 2 °C-8 °C.
- 20

- 25 *Activación/Conjugación:* El procedimiento de activación/conjugación para el polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. aureus* consistió en las siguientes etapas: 1) Combinación del polisacárido; 2) Congelación superficial y liofilización de CRM<sub>197</sub> y el polisacárido combinado; 3) Disolución del polisacárido liofilizado y CRM<sub>197</sub>; 4) Activación del polisacárido; 5) Conjugación del polisacárido activado con CRM<sub>197</sub> y 6) Purificación del conjugado (dilución, diafiltración, filtración estéril).

- 30 El polisacárido se combinó con 10 gramos de excipiente 1,2,4-triazol por gramo de polisacárido. El excipiente se añadió al polisacárido como un polvo, con una disolución que se obtiene tras menos de 15 minutos de mezclado a temperatura ambiente.

El polisacárido combinado y la CRM<sub>197</sub> se congelaron superficialmente por separado usando un baño de etanol a -75 °C. El volumen por frasco de 1 l era de aproximadamente 500 ml.

- 35 Para la disolución de polisacárido, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales de polisacárido para obtener una suspensión y a continuación se transfirió al recipiente de reacción de activación/conjugación para calentar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Se obtuvo una disolución transparente tras 5-10 minutos de mezclado.

- 40 Para la disolución de CRM<sub>197</sub>, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales que contenían CRM<sub>197</sub> para obtener una suspensión y a continuación se transfirió a un segundo recipiente para mezclar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Normalmente, se obtuvo una disolución transparente en menos de 15 minutos.

- 45 Se obtuvieron muestras de la disolución de polisacárido/DMSO para el análisis de Karl Fischer para determinar el contenido en humedad. Se preparó CDT como una disolución 100 mg/ml en DMSO y se añadió a un exceso molar de 5 con respecto al polisacárido de tipo 5 (el procedimiento complejo usó 20 equivalentes molares de CDT mientras que el procedimiento en un solo frasco usaba 5 equivalentes molares de CDT:CP5). La adición continua de la disolución de CDT se realizó a lo largo de aproximadamente 5 minutos a 23 °C + 2 °C con mezclado. Se dejó avanzar la reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C ± 2 °C. Se obtuvieron muestras de la reacción para determinar el nivel de activación (UV 220/205 nm) y a continuación se añadió borato de sodio 100 mM, pH 9 hasta obtener una disolución acuosa al 1,5 %. A continuación se agitó la disolución de reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C + 2 °C.

- 50 Para la conjugación del polisacárido activado con CRM<sub>197</sub>, se añadió DMSO para alcanzar una concentración de reacción de 0,55 mg/ml. El CRM<sub>197</sub> disuelto en DMSO se añadió a continuación a la disolución de polisacárido activado con mezclado. Se agitó la reacción durante un mínimo de 16 horas a 23 °C + 2 °C.

- 55 La disolución de reacción se diluyó 10X con tetraborato de sodio 5 mM, pH 8,6 para obtener un pH de diluido final de 9 ± 0,2. La disolución se agitó a 23 ± 3 °C durante un mínimo de 4 horas. La disolución diluida se pasó a través de un filtro de 5 µm y se concentró hasta una concentración de retentato objetivo de 2 g/l. La filtración de flujo

tangencial se realizó usando membranas de celulosa regeneradas de 300K a través de 20 diavolúmenes con succinato 5 mM, pH 7. La exposición de membrana típica fue de 1 gramo/0,092903 m<sup>2</sup>. El conjugado purificado se pasó a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

5 **Ejemplo 12: Conjugación del polisacárido capsular de serotipo 5 usando el procedimiento de conjugación en un solo recipiente y el complejo.**

El presente ejemplo demuestra que el intervalo preseleccionado de pesos moleculares de los polisacáridos de cápsula puede usarse para conjugación o bien en el procedimiento en un solo recipiente o bien en el complejo. Las células bacterianas producen inicialmente los polisacáridos más grandes y el intervalo de pesos moleculares purificado resultante puede controlarse mediante el pH y el calor del procedimiento de hidrólisis del ejemplo 9. En el presente ejemplo, se seleccionaron ocho lotes en que el peso molecular del polisacárido capsular de serotipo 5 variaba de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 140 kDa y se realizó la conjugación usando activación con triazol (CDT) en los procedimientos o bien en un solo recipiente o bien el complejo que se describen anteriormente. Véase la tabla 19. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes variaban de 1.125 kDa a 2.656 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM variaba de un número alto de 22 a un número bajo de 15. El azúcar libre variaba de un número alto de un 23 % a un número bajo de un 11 %.

Tabla 19: Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados con polisacáridos capsulares de 90 kDa a 140 kDa.

Procedimiento	Serie	PM Poli (kDa)	Rendimiento de sac. (%)	Azúcar libre (%)	PM mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas
En un solo recipiente	1	142	93	11	1.932	19
	2	108	93	14	1.117	20
	3	142	85	17	1.609	15
	4	108	86	23	1.125	15
Complejo	1	121	63	11	2.130	19
	2	92	72	16	1.533	22
	3	119	74	14	2.656	15
	4	115	63	18	1.911	15

20 **Ejemplo 13: Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 presentan sistemáticamente protección en el modelo de pielonefritis murino.**

Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 se evaluaron en cuanto a su capacidad para proteger a ratones en un modelo de pielonefritis. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición a *S. aureus* i.p. se redujeron significativamente en comparación con los controles inmunizados con PBS.

25 Los seis estudios individuales mostraron una reducción significativa en ufc/ml de riñones en los animales inmunizados (figura 9). Cuando estos estudios se agruparon para metanálisis, la significación global para los estudios como un todo aumentó hasta por debajo de 0,0001. Los datos mostraron una reducción constante de la colonización de los riñones tras las vacunaciones activas con el conjugado de polisacárido capsular.

**Ejemplo 14: Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados mediante diferentes químicas de conjugación protegen a los ratones frente a infecciones experimentales.**

30 Los estudios de inmunización activa en el modelo de pielonefritis murino se llevaron a cabo con conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados mediante química o bien de PDPH o bien de CDT. Los procedimientos para conjugar polisacáridos capsulares con CRM<sub>197</sub> se describen anteriormente. Los resultados mostraron que ambos conjugados reducen la colonización en ratones en comparación con animales inmunizados de forma simulada (tabla 20).

35 Tabla 20: Efecto de la conjugación de PDPH frente a la de CDT sobre la protección frente a exposición a *S. aureus* en el modelo de pielonefritis.

Estudio N°	Antígenos	Cepa/Dosis	Log UFC/Riñón	Significación
<b>Estudio 1</b>	Solución salina + AIPO <sub>4</sub>	PFESA0266	5,53 ± 1,90	--
	1 mcg de CP5-CRM (PDPH) + AIPO <sub>4</sub>	2 x 10 <sup>8</sup>	3,01 ± 1,83	p < 0,001
	1 mcg de CP5-CRM (CDT) + AIPO <sub>4</sub>		1,67 ± 0,23	p < 0,0001
<b>Estudio 2</b>	Solución salina + AIPO <sub>4</sub>	PFESA0266s	6,17 ± 1,76	--
	1 mcg de CP5-CRM (PDPH) + AIPO <sub>4</sub>	2,7 x 10 <sup>8</sup>	3,06 ± 1,69	p < 0,0001
	1 mcg de CP5-CRM (CDT) + AIPO <sub>4</sub>		1,87 ± 0,69	p < 0,0001

**Ejemplo 15: La inmunización activa de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 protege a ratas en un modelo de endocarditis de rata.**

Se llevaron a cabo cuatro estudios con conjugado por PDPH CP5-CRM<sub>197</sub>. Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 reducían significativamente las UFC recuperadas después de una exposición a *S. aureus* PFESA0266 tanto en el corazón como los riñones en 2 de 3 experimentos (tabla 21). En el tercer estudio, el título anti-CP5 medio geométrico (TMG) fue el más bajo de los tres experimentos, pero fue sólo ligeramente más bajo que en el experimento previo.

Tabla 21: La inmunización con polisacárido capsular de serotipo 5-CRM<sub>197</sub> reduce las UFC en un modelo de endocarditis de rata.

Composición inmunogénica	Cepa/Dosis de exposición	Log UFC Recuperadas		Significación		TMG
		Corazón	Riñón	Corazón	Riñón	Título de CP
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,34± 1,78	3,92± 1,73			103.000
1 mcg de PP5-CRM	2,21 x 10 <sup>8</sup> ufc	7,94± 0,78	6,77± 0,79	p < 0,001	p < 0,05	
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,43± 2,30	3,11± 2,33			51.000

(continuación)

Composición inmunogénica	Cepa/Dosis de exposición	Log UFC Recuperadas		Significación		TMG
		Corazón	Riñón	Corazón	Riñón	Título de CP
Solución salina	6,5 x 10 <sup>7</sup> ufc	5,63± 2,48	4,19± 2,05	No	No	
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,01± 2,49	3,90± 1,92			67.000
Solución salina	4,0 x 10 <sup>8</sup> ufc	7,52± 1,38	6,52± 1,17	p < 0,0002	p < 0,0002	

**Ejemplo 16: Inmunogenicidad potenciada de vacunas de conjugado de CP5 HMW en ratones en comparación con vacunas de conjugado de CP5 LMW**

Se realizó un estudio de pielonefritis murina para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de diferentes formulaciones de conjugado de CP5. Se sometieron a prueba dos formulaciones: La primera formulación estaba compuesta por un CP5 de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 300 kDa) conjugado con CRM<sub>197</sub>. La segunda formulación contenía un CP5 de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM<sub>197</sub>. Se sometieron a prueba tres niveles de dosis para la vacuna de HMW (1, 0,1 y 0,01 mcg). La vacuna de LMW se sometió a prueba a 1 mcg. También se incluyó un grupo de control negativo compuesto por una vacuna de conjugado de polisacárido obtenido de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con CRM<sub>197</sub> (PP5). Los polisacáridos se formularon con 22 mcg de AIPO4 en las semanas 0, 3 y 6 y se expusieron a *S. aureus* PFESA0266 en la semana 8. Se extrajeron los riñones se y se contaron las colonias bacterianas 48 horas después de una exposición. Ambas vacunas fueron eficaces para generar una respuesta inmunitaria y se observó una reducción en las UFC de *S. aureus* PFESA0266 en los riñones de los ratones vacunados con los grupos de 1 µg de vacuna tanto de HMW como de LMW. Esta era dependiente de la dosificación tal como se demuestra mediante la eficacia reducida con respecto a las dosificaciones de vacuna más bajas (figura 10). La lectura de UFC no era suficientemente sensible para detectar una diferencia en cuanto a la eficacia para las vacunas de HMW y de LMW. Por lo tanto, los sueros de los ratones se sometieron a prueba mediante OPA. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero necesaria para destruir el 40 % de *S. aureus* cepa PFESA0266 en un ensayo de OPA. Se observaron títulos aumentados de OPA para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (figura 11).

**Ejemplo 17: Los conjugados de polisacárido de cápsula que comprenden polisacáridos de alto peso molecular muestran una inmunogenicidad potenciada en comparación con los conjugados que comprenden polisacáridos de bajo peso molecular.**

Se llevaron a cabo estudios en primates no humanos (PNH) para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones de conjugado de cápsula. Se sometieron a prueba dos formulaciones a dos niveles de dosificación diferentes (2 y 20 µg). La primera formulación contenía un polisacárido de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 130 kDa) conjugado con CRM<sub>197</sub>. La segunda formulación contenía un polisacárido de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM<sub>197</sub>. Se vacunaron grupos de cinco primates con una dosis única de una u otra de vacuna y se controlaron los títulos inmunitarios antes de la vacunación y dos semanas después de la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero necesaria para destruir el 40 % de *S. aureus* cepa PFESA0266 en un ensayo de OPA. Además se controlaron los títulos de anticuerpos mediante ELISA. Se observó una actividad potenciada para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (tabla 22), lo que se evidencia por un aumento de diez veces en los títulos de anticuerpos para la vacuna de HMW en comparación con la vacuna de LMW. La tasa de animales que responden al OPA para los

PNH que recibieron la vacuna de HMW fue también más alta (un 80 % en comparación con un 40 %).

Tabla 22. Se observa una inmunogenicidad potenciada para las vacunas de conjugado de polisacárido de HMW en comparación con la vacuna de conjugado de polisacárido de LMW.

	Nivel de dosis de CP5-CRM197 (mcg) por animal	Media geométrica de PD1*	Tasa de animales que responden a OPA (%)±
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

\* Aumento en veces calculado a partir del título de ELISA de CP5 2 semanas tras la vacunación en comparación con los títulos antes de la vacuna. ± Tasa de animales que responden calculada a partir de monos que generan un aumento en el título de OPA después de una dosis única de vacuna 2 semanas tras la vacunación. Cada grupo contenía 5 macacos Rhesus y las vacunas se formularon con AIPO4 (250 mcg/dosis)

5 **Ejemplo 18: La O-acetilación del polisacárido es importante para la inducción de respuestas de anticuerpos protectoras frente al conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5.**

Para evaluar la importancia de la O-acetilación del polisacárido capsular de serotipo 5, se O-desacetiló el polisacárido capsular nativo (dOAc) y conjugado con CRM<sub>197</sub> (dOAc-CRM<sub>197</sub>) usando química de conjugación de PDPH, tal como se analiza anteriormente. La eficacia del conjugado de dOAcCP-CRM<sub>197</sub> se comparó junto con CP5-CRM<sub>197</sub> en un modelo de pielonefritis murino.

La inmunización con conjugados carentes de grupos O-acetilo (dOAc CP5-CRM) no reducía las UFC bacterianas recuperadas en los riñones. Estos datos (tabla 23) indican que la O-acetilación es importante para suscitar anticuerpos funcionales frente a CP5.

15 Tabla 23: La inmunización con conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 des-O-acetilados no protegía a los ratones frente a la colonización del riñón.

Estudio N°	Antígenos	Cepa/Dosis	Log UFC/Riñón	Significación
Estudio 1	1 mcg de PP5-CRM	PFESA0266	3,89 ± 2,24	valor p < 0,008
	1 mcg de dOAc CP5-CRM	7 x 10 <sup>8</sup>	4,20 ± 1,75	
	1 mcg de CP5-CRM		1,75 ± 0,39	
Estudio 2	Solución salina	PFESA0266	5,08 ± 1,96	valor p < 0,02
	1 mcg de dOAc CP5-CRM	2,4 x 10 <sup>8</sup>	5,89 ± 1,29	
	1 mcg de CP5-CRM		2,93 ± 2,11	

**Ejemplo 19: Confirmación de la importancia de la O-acetilación como epítipo funcional del polisacárido capsular de serotipo 5 mediante OPA usando anticuerpos monoclonales con especificidades conocidas.**

20 Se evaluaron anticuerpos monoclonales frente a polisacárido capsular de serotipo 5 con especificidades para OAc+ (CP5-7-1), OAc+/- (CP5-5-1) y OAc- (CP5-6-1), en cuanto a la actividad de destrucción OP frente a la cepa PFESA0266 de tipo 5 (tabla 24). Se usaron anticuerpos monoclonales frente a polisacárido capsular de serotipo 8 (CP8-3-1 específico frente a CP8 OAc+) como control negativo.

25 El Acm CP5-7-1, anti-CP5 específico de OAc, mediaba la destrucción de *S. aureus* PFESA0266 (tabla 24). También el anticuerpo monoclonal CP5-5-1, que reconoce epítipos compartidos tanto por CP5 OAc+ como por CP5 OAc-, mediaba la destrucción de la cepa PFESA0266. El anticuerpo monoclonal específico para epítipos presentes en polisacárido capsular OAc- de serotipo 5 no mediaba la destrucción de la cepa PFESA0266. Estos resultados indican que son necesarios epítipos de O-acetilo en el polisacárido capsular de serotipo 5 para suscitar una actividad funcional de los anticuerpos específicos para serotipo 5.

30 Los anticuerpos necesitan ser funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que supervisa la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

Tabla 24: Los anticuerpos monoclonales específicos frente a polisacárido capsular de serotipo 5 O-acetilado (+) y polisacárido capsular de serotipo 5 O- y des-O-acetilado (+/-) son opsónicos frente a *S. aureus* PFESA0266 (tipo 5).

CP5-5-1 (O-Ac +/-) (mcg) 20				CP5-6-1 (O-Ac -) (mcg)				CP5-7-1 (O-Ac +) (mcg)				CP8-3-1 (-control) (mcg)			
10 5 2,5				20 10 5 2,5				20 10 5 2,5				20 10 5 2,5			
28	33	30	21	-12	-5	-12	-5	31	46	49	55	-18	-3	-13	-5

Datos notificados como porcentaje de destrucción y calculados determinando la proporción del número de UFC que sobrevivieron a los 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de UFC que sobrevivieron en pocillos carentes de anticuerpos pero que contenían bacterias, complemento y células HL-60.

**Ejemplo 20: Se observa una inmunogenicidad potenciada para los conjugados de CP5 compuestos por polisacáridos de alto peso molecular en comparación con polisacáridos de bajo peso molecular en primates no humanos (PNH).**

- 5 Se llevaron a cabo estudios en primates no humanos (PNH) para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones de conjugado de cápsula. Se sometieron a prueba dos formulaciones a dos niveles de dosificación diferentes (2 y 20 µg). La primera formulación estaba compuesta por un polisacárido de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 130 kDa) conjugado con CRM<sub>197</sub>. La segunda formulación contenía un polisacárido de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM<sub>197</sub>. Se vacunaron grupos de cinco primates con una dosis única de una u otra vacuna y se controlaron los títulos inmunitarios antes de la vacunación y dos semanas tras la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero necesaria para destruir el 40 % de *S. aureus* cepa PFESA0266 en un ensayo de OPA. También se controlaron los títulos de anticuerpos mediante ELISA. Se observó una actividad potenciada para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (tabla 25). Hubo un aumento de tres a diez veces en los títulos de anticuerpos para la vacuna de HMW en comparación con la vacuna de LMW. La tasa de animales que responden a OPA para los PNH que recibieron la vacuna de HMW fue también más alta (un 80 % en comparación con un 40 %).

Tabla 25: Se observa una inmunogenicidad potenciada para las vacunas de conjugado de polisacárido de HMW en comparación con la vacuna de conjugado de polisacárido de LMW.

	Nivel de dosis de CP5-CRM197 (mcg) por animal	Media geométrica de PD1*	Tasa de animales que responden a OPA (%) $\pm$
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

\* Aumento en veces calculado a partir del título de ELISA de CP5 2 semanas tras la vacunación en comparación con los títulos antes de la vacuna.  $\pm$  Tasa de animales que responden calculada a partir de monos que generan un aumento en el título de OPA después de una dosis única de vacuna 2 semanas tras la vacunación. Cada grupo contenía 5 macacos Rhesus y las vacunas se formularon con AIPO4 (250 mcg/dosis)

## 20 RESUMEN

Las dos químicas de conjugación que se describen en el presente documento produjeron polisacárido capsular de serotipo 5 unido covalentemente con la proteína transportadora CRM<sub>197</sub>. No hubo diferencias significativas en sacárido libre, la proporción de polisacárido de serotipo 5:proteína y los rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de *Staphylococcus aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora, en el que el polisacárido tiene un peso molecular de entre 80 kDa y 120 kDa, en el que el conjugado tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 1.100 kDa, en el que la proteína transportadora es CRM<sub>197</sub> unida covalentemente al polisacárido a través de un enlace carbamato y un enlace amida usando química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol) o CDT (1,1-carbonil-di-(1,2,4)-triazol)) y que da como resultado un enlazador de un carbono y de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína transportadora, y en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de entre el 75-100 %.
- 10 2. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 1, en el que la proporción molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM<sub>197</sub> es de 10:1 a 25:1.
- 15 3. El conjugado inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que se produce al menos un enlace covalente entre CRM<sub>197</sub> y el polisacárido al menos en cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido o cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.
4. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la CRM<sub>197</sub> comprende de 5 a 22 o de 5 a 23 lisinas unidas covalentemente al polisacárido.
5. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la CRM<sub>197</sub> comprende de 8 a 12 o de 8 a 15 lisinas unidas covalentemente al polisacárido.
- 20 6. Una composición inmunogénica que comprende el conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y al menos uno de un adyuvante, diluyente o transportador.
7. La composición inmunogénica de la reivindicación 6, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.
- 25 9. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.
10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende menos de un 30 % de polisacárido de tipo 8 libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 8.
11. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende menos de un 20 % de polisacárido de tipo 8 libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 8.
- 30 12. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 11 para su uso en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria frente a *Staphylococcus aureus* en un sujeto.
13. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 para su uso en un procedimiento de reducción o prevención de una infección estafilocócica.
- 35 14. La composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 13, en la que la infección se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus* invasivo, septicemia y estado de portador.

FIGURA 1

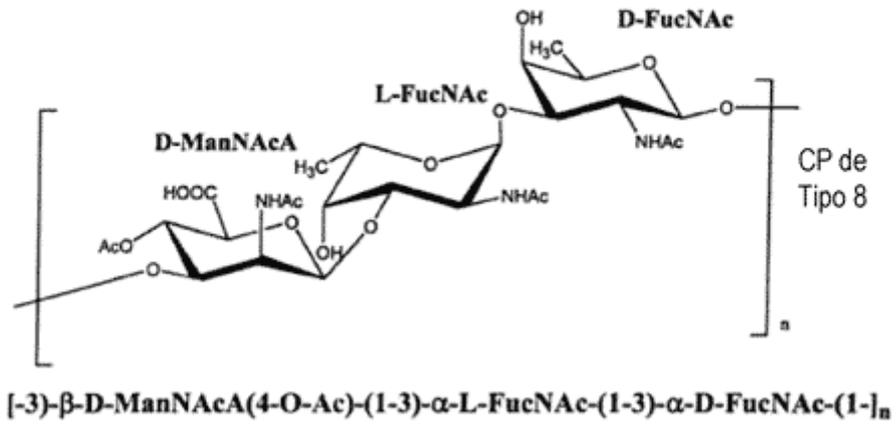
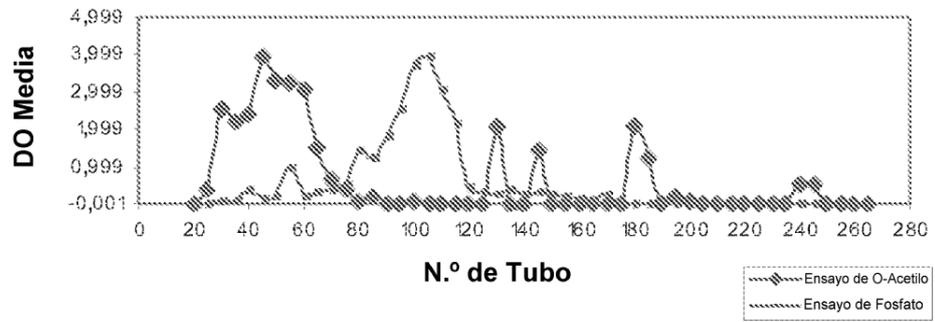
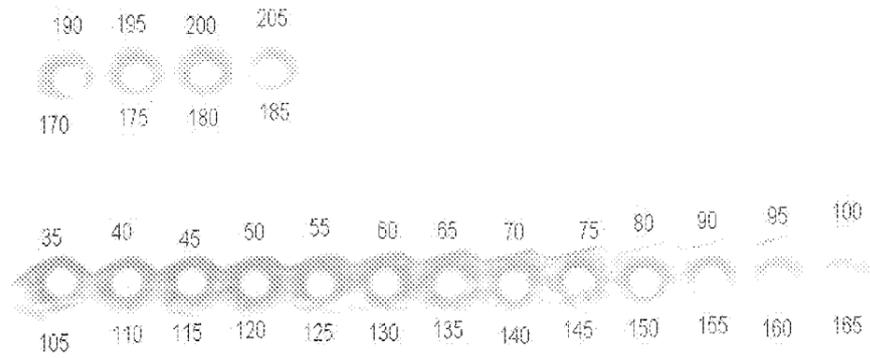


FIGURA 2

A.

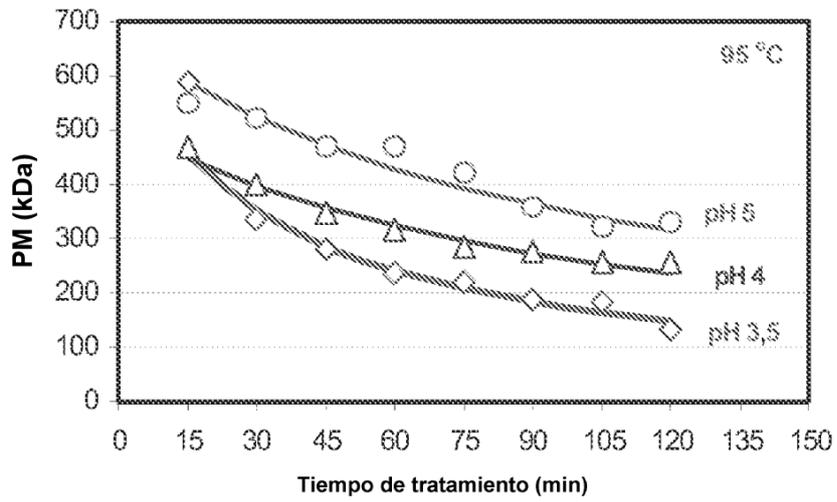


B.



**FIGURA 3**

**Efecto del pH sobre el PM de CP-8**



**Efecto de la temperatura sobre el PM de CP-8**

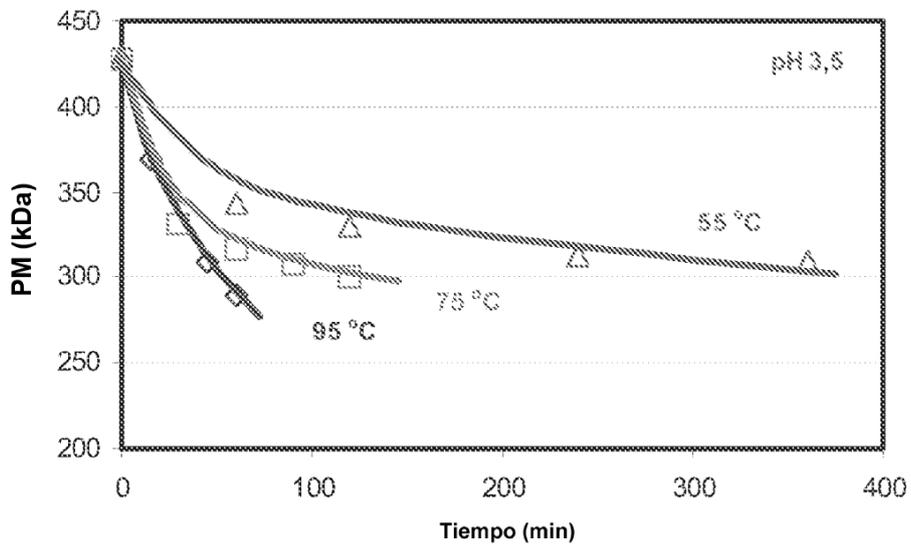


FIGURA 4

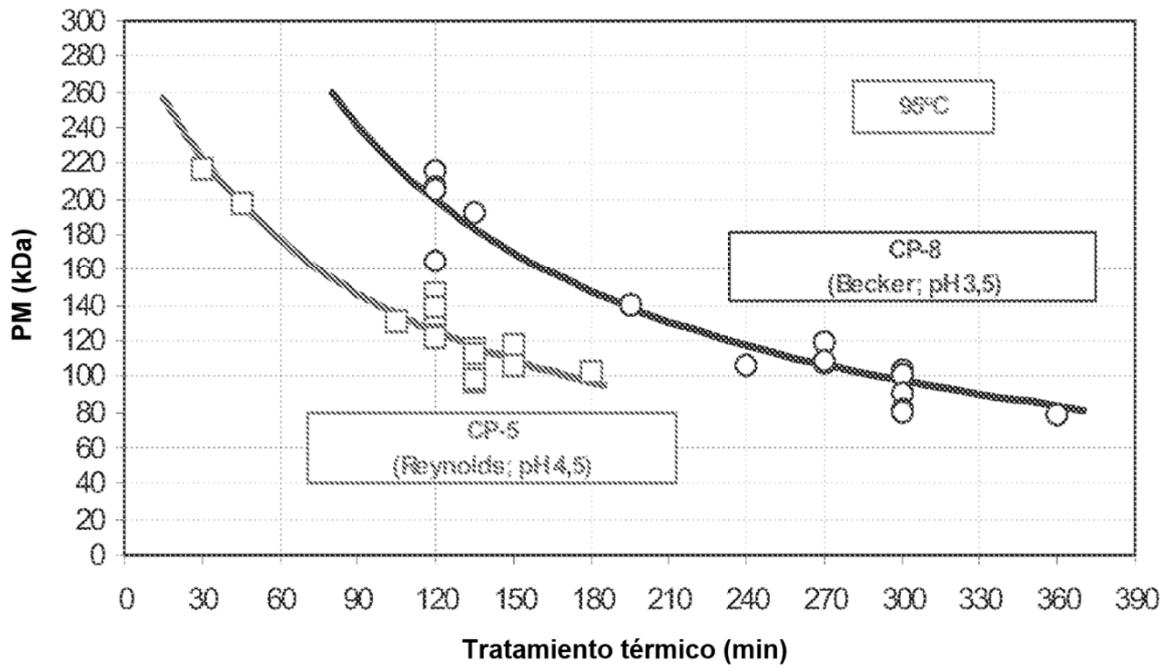


FIGURA 5

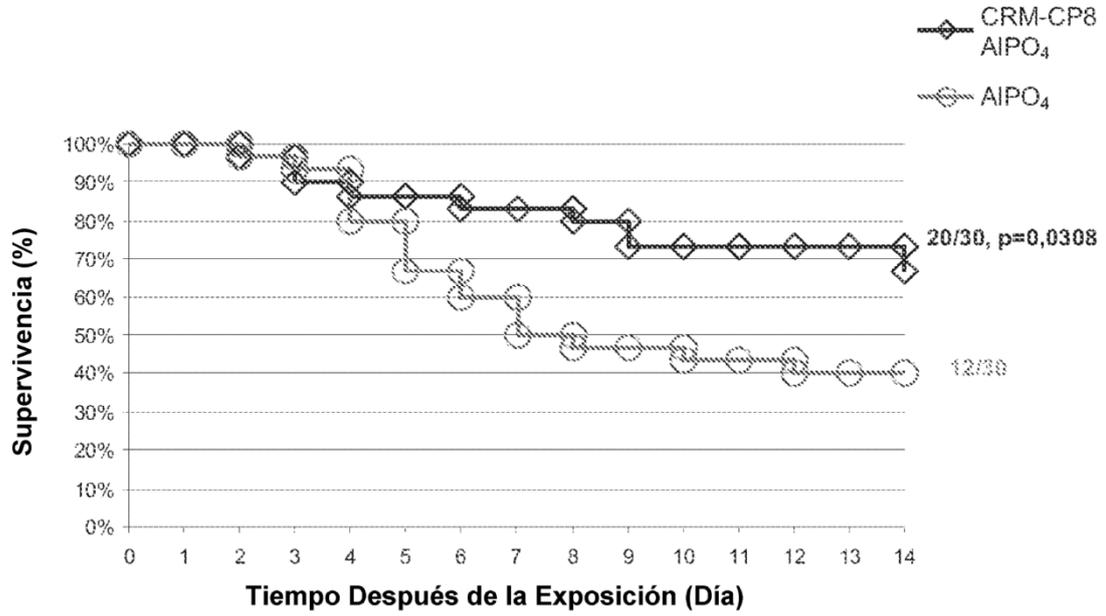


FIGURA 6

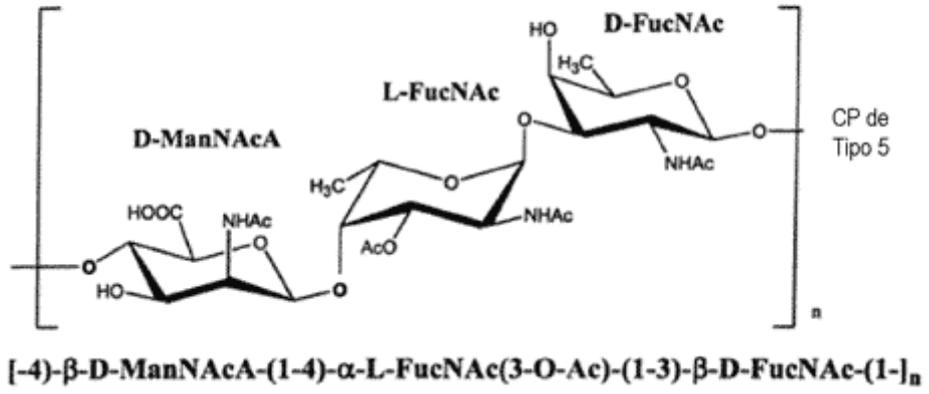
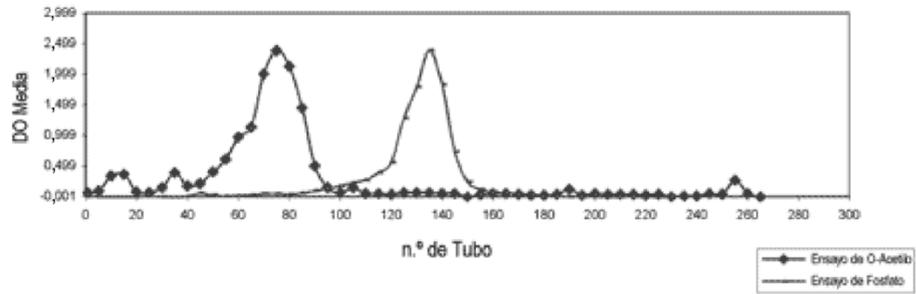


FIGURA 7

A.



B.

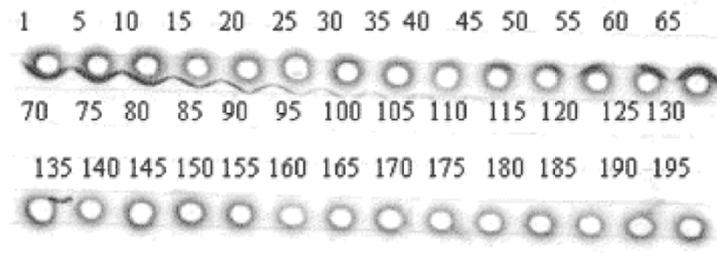
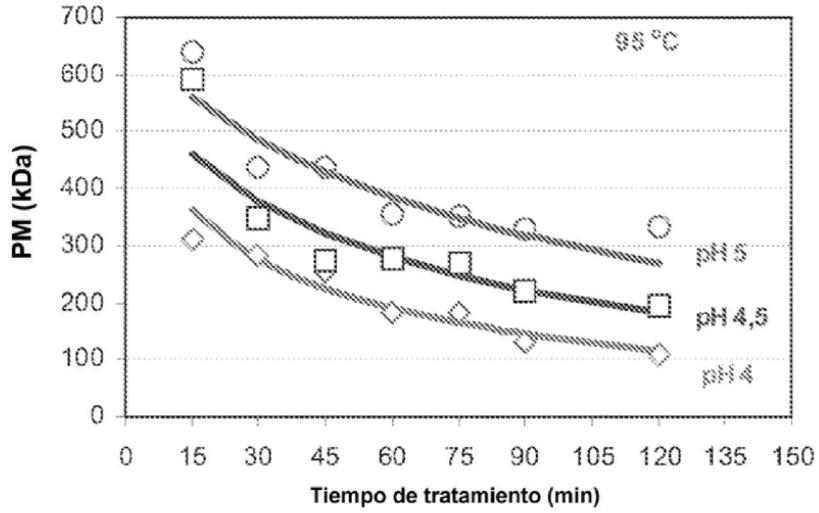


FIGURA 8

**A**

**Efecto del pH sobre el PM de CP-5**



**B**

**Efecto de la temperatura sobre el PM de CP-5**

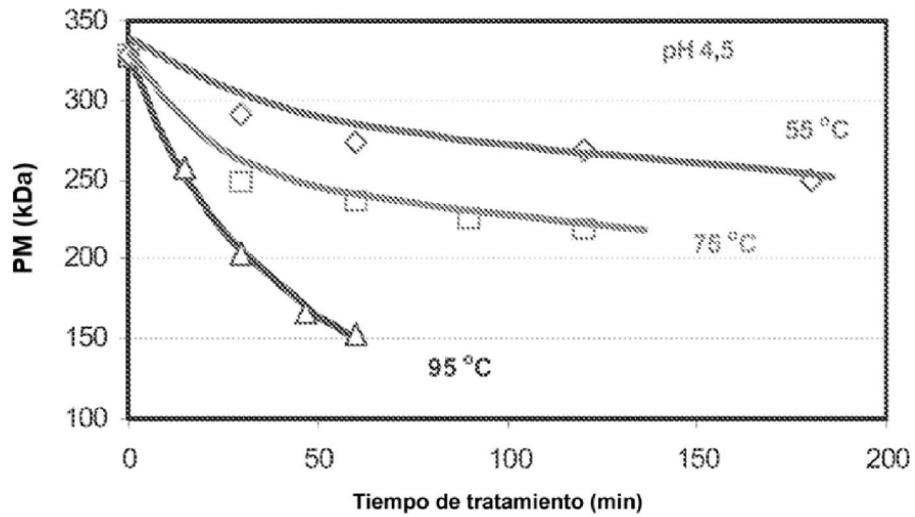


FIGURA 9

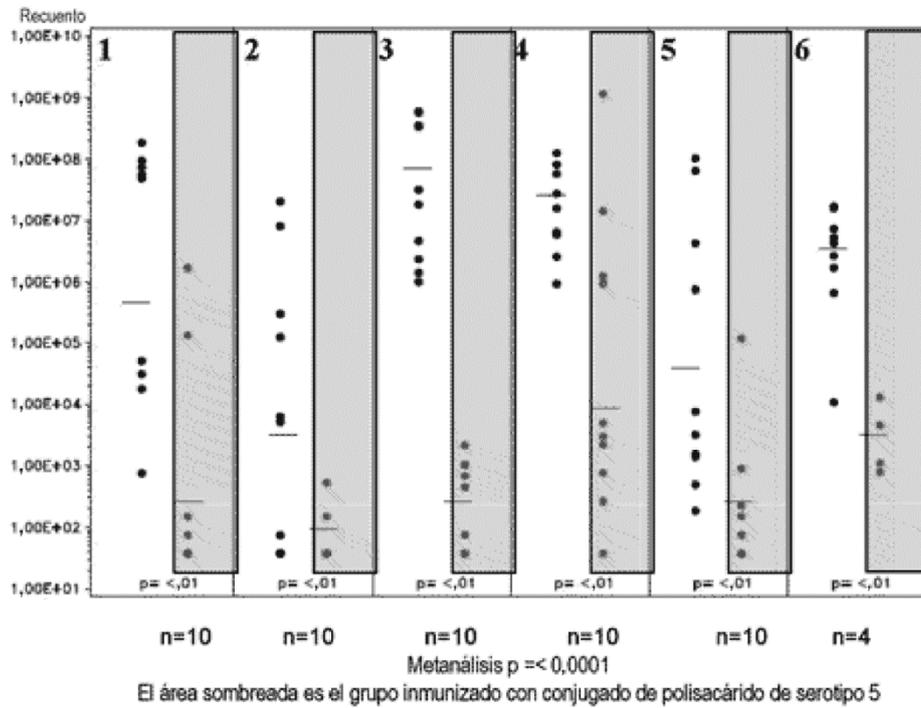


FIGURA 10

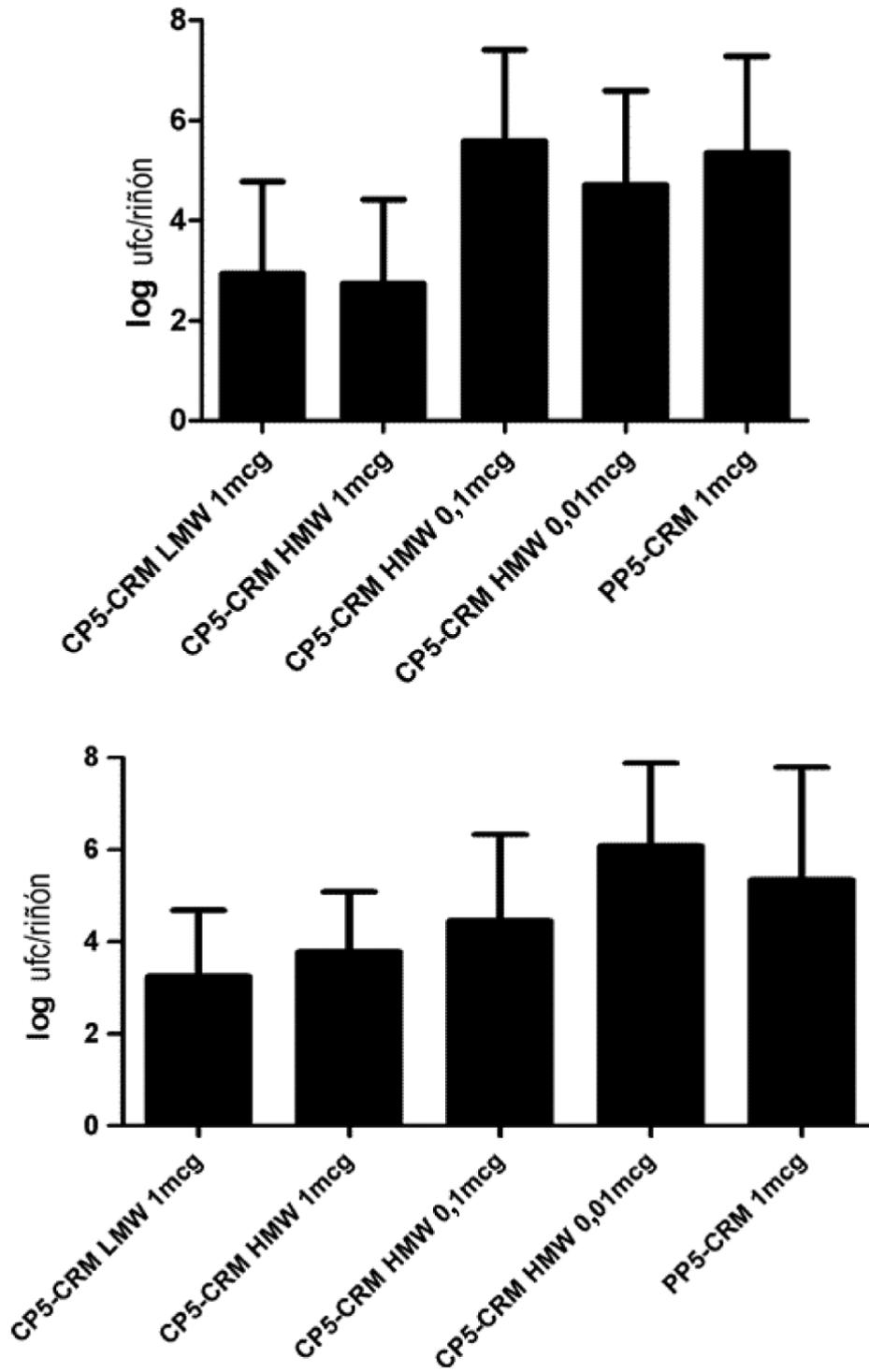


FIGURA 11

