(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 755 082**

(51) Int. CI.:

C07H 3/06 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/IB2013/060933**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14097099**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13828822 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2935299**

(54) Título: **Procedimiento de glucoconjugación**

(30) Prioridad:

20.12.2012 US 201261740311 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

HAN, MINGMING;
KAINTHAN, RAJESH KUMAR;
KIM, JIN-HWAN y
PRASAD, AVVARI KRISHNA

(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

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de glucoconjugación

Campo

La presente divulgación se refiere generalmente a procedimientos para preparar glucoconjugados que contienen un sacárido conjugado a una proteína transportadora mediante el uso de TEMPO/NCS como un agente oxidante, a composiciones inmunógenas que comprenden dichos glucoconjugados, y a procedimientos para la preparación y el uso de tales glucoconjugados y composiciones inmunógenas. La presente divulgación se refiere también a procedimientos para preparar glucoconjugados que contienen un sacárido conjugado a una proteína transportadora, mediante el uso de radicales de nitroxilo o nitróxido estables tales como compuestos de piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi en presencia de un antioxidante para oxidar selectivamente los hidroxilos primarios del mencionado sacárido, a composiciones inmunógenas que comprenden dichos glucoconjugados, y a procedimientos para la preparación y el uso de tales glucoconjugados y composiciones inmunógenas.

Antecedentes

Las vacunas de conjugados de polisacárido proteína se preparan usando polisacáridos, generalmente del recubrimiento superficial de las bacterias, unidos a transportadores de proteínas. la unión química del polisacárido y el transportador de proteínas induce una respuesta inmunitaria contra las bacterias que presentan el polisacárido contenido en la vacuna sobre su superficie, previniendo por tanto la enfermedad. Por consiguiente, la vacunación que utiliza polisacáridos de bacterias patógenas es una estrategia potencial para reforzar la inmunidad del hospedador. Los polisacáridos que cubren bacterias varían mucho, incluso en una única especie de bacteria. Por ejemplo, en *Streptococcus pneumoniae* (una causa principal de meningitis, neumonía y enfermedad invasiva grave en bebés y niños pequeños en todo el mundo) existen más de 90 serotipos diferentes debido a la variación en el recubrimiento de polisacáridos bacterianos. Por lo tanto, las vacunas de polisacáridos consisten a menudo en un panel de polisacáridos para aumentar la protección.

Aunque los polisacáridos son inmunógenos por sí mismos, se ha utilizado la conjugación de polisacáridos a transportadores de proteínas para aumentar la inmunogenicidad. La proteína transportadora puede ser cualquiera de un antígeno de una proteína relacionada procedente del patógeno diana, que refuerza la respuesta inmunoespecífica de este patógeno, o una proteína generalmente inmunógena que sirve más como un adyuvante o un estimulante de la respuesta inmunitaria general.

Se han autorizado durante muchos años vacunas de conjugados de polisacárido-proteína neumocócica multivalente y han demostrado ser valiosas en la prevención de la enfermedad neumocócica en niños y se han recomendado recientemente para adultos.

Ma Z y col. (Carbohydrate Research 346 (2011) 343-347) desvela un procedimiento para la conjugación controlada de polisacáridos con BSA basado en la oxidación de los polisacáridos con una preparación de TEMPO-hipoclorito de sodio seguida por la conjugación con BSA.

El documento WO2011/138636 desvela la generación de glucoconjugados a partir de S. *aureus* de tipo 5 y tipo 8 D2 usando sales de peryodato (por ejemplo, NaIO4) o tetraóxido de osmio (OsO4) para oxidar grupos hidroxilo próximos.

Einhorn y col. (J. Org. Chem. 1996, 61, 7452-7454) desvela la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos utilizando TEMPO y N-clorosuccinimida, en un sistema tampón acuoso de diclorometano bifásico a pH 8,6 en presencia de cloruro de tetrabutilamonio.

Sumario

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado a una proteína transportadora, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un disolvente acuoso para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina. En un aspecto adicional, el grado de oxidación del sacárido activado varía de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 5, de 3 a 40, de 3 a 30, de 3 a 20, de 3 a 10, de 4 a 40, de 4 a 30, de 4 a 20, de 4 a 10, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 10, de 6 a 50, de 6 a 40, de 6 a 30, de 6 a 20, de 6 a 15, de 6 a 14, de 6 a 13, de 6 a 12, de 6 a 11, de 6 a 10, de 7 a 40, de 7 a 30, de 7 a 20, de 7 a 15, de 7 a 14, de 7 a 13, de 7 a 12, de 7 a 11, de 7 a 10, de 8 a 40, de 8 a 30, de 8 a 20, de 8 a 15, de 8 a 14, de 8 a 13, de 8 a 13, de 8 a 12, de 8 a 11, de 8 a 10, de 9 a 40, de 9 a 30, de 9 a 20, de 9 a 15, de 10 a 40, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15. En un aspecto adicional, el grado de oxidación del sacárido activado es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado a una proteína transportadora, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un compuesto radical de nitroxilo o nitróxido, tal como compuestos de piperidina-N-oxi o pirrolidina-

N-oxi, en presencia de un oxidante para oxidar selectivamente los hidroxilos primarios del mencionado sacárido para producir un sacárido activado que contiene grupos aldehídos; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina.

En dicha reacción, el oxidante real es la sal de N-oxoamonio, en un ciclo catalítico. Preferentemente, los compuestos con radicales nitroxilo o nitróxido estables tienen la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario a aldehídos, en presencia de un oxidante, sin sobreoxidación a ácidos carboxílicos.

En un aspecto, la etapa a) de la reacción se lleva a cabo en un disolvente acuoso. En otro aspecto, la etapa a) se lleva a cabo en un disolvente aprótico. En un aspecto, la etapa a) se lleva a cabo en DMSO (dimetilsulfóxido), Dimetilacetamida (DMA), Sulfolano, N-Metil-2-pirrolidona (NMP), Hexametilfosforamida (HMPA) o en disolvente DMF (dimetilformamida).

En un aspecto, los grupos aldehído sin reaccionar se convierten posteriormente en alcoholes primarios durante la etapa de protección, usando borohidruro, tras la conjugación con la proteína transportadora, minimizando por tanto la modificación del epítopo del sacárido durante las etapas de modificación que implican la oxidación seguida por conjugación.

En un aspecto, dichos compuestos de radicales de nitroxilo o nitróxido estables son los compuestos de piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi. Preferentemente, dichos compuestos tienen la capacidad de oxidar selectivamente los alcoholes primarios en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin afectar a los grupos hidroxilo secundarios. Más preferentemente, dichos compuestos tienen la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin sobreoxidación de los grupos carboxilo.

En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable transporta un resto TEMPO o un resto PROXYL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi). Preferentemente, dicho compuesto tiene la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin afectar a los grupos hidroxilo secundarios. Más preferentemente, dicho compuesto tiene la capacidad de oxidar selectivamente los alcoholes primarios en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin sobreoxidación de los grupos carboxilo.

En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO o un derivado del mismo. En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable se selecciona entre el grupo que consiste en TEMPO, 2,2,6,6-Tetrametil-4-(metilsulfoniloxi)-1-piperidinoxi, 4-fosfonoxi-TEMPO, 4-Oxo-TEMPO, 4-Metoxi-TEMPO, 4-Isotiocianato-TEMPO, 4-(2-Yodoacetamido)-radical libre TEMPO, 4-Hidroxi-TEMPO, 4-Ciano-TEMPO, 4-Carboxi-TEMPO, 4-(2-Bromoacetamido)-TEMPO, 4-Amino-TEMPO, 4-Acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxilo. preferentemente, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO.

En un aspecto adicional, dicho compuesto de radical nitroxilo estable se selecciona entre el grupo que consiste en 3β-DOXYL-5α-colestano, 5-DOXYL-ácido esteárico, 16-DOXYL-ácido esteárico, 5-DOXYL-estearato de metilo, 3-(Aminometil)-PROXYL, 3-Carbamoil-PROXYL, 3-Carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxilo, 3-Carboxi-PROXYL, 3-Ciano-PROXYL.

En un aspecto, dicho oxidante es una molécula que transporta un resto N-halo. Preferentemente, dicha molécula tiene la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un compuesto de radical nitroxilo.

En un aspecto, dicho oxidante se selecciona entre el grupo que consiste en N-Clorosuccinimida, N-Bromosuccinimida, N-Yodosuccinimida, Ácido dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, Ácido dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, Ácido diiodoisocianúrico y 1,3,5-triyodo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona. Preferentemente, dicho oxidante es N-Clorosuccinimida.

En un aspecto, el grado de oxidación del sacárido activado varía de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 5, de 3 a 40, de 3 a 30, de 3 a 20, de 3 a 10, de 4 a 40, de 4 a 30, de 4 a 20, de 4 a 10, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 10, de 6 a 50, de 6 a 40, de 6 a 30, de 6 a 20, de 6 a 15, de 6 a 14, de 6 a 13, de 6 a 12, de 6 a 11, de 6 a 10, de 7 a 40, de 7 a 30, de 7 a 20, de 7 a 15, de 7 a 14, de 7 a 13, de 7 a 12, de 7 a 11, de 7 a 10, de 8 a 40, de 8 a 30, de 8 a 20, de 8 a 15, de 8 a 14, de 8 a 13, de 8 a 13, de 8 a 12, de 8 a 11, de 8 a 10, de 9 a 40, de 9 a 30, de 9 a 20, de 9 a 15, de 10 a 40, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15. En un aspecto adicional, el grado de oxidación del sacárido activado es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40.

En un aspecto, el sacárido se hace reaccionar con 0,1 a 10 equivalentes molares de oxidante. Preferentemente, el sacárido se hace reaccionar con 0,2 a 5, 0,5 a 2,5 o 0,5 a 1,5 equivalentes molares de oxidante. En un aspecto, el polisacárido se hace reaccionar con aproximadamente 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 o 5 equivalentes molares de oxidante.

En un aspecto, el compuesto de radical de nitroxilo o nitróxido estable está presente en una cantidad catalítica. En un aspecto, el sacárido se hace reaccionar con menos de aproximadamente 0,3 equivalentes molares de compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable. En un aspecto, el sacárido se hace reaccionar con menos de aproximadamente 0,005 equivalentes molares de compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable. En un aspecto, el sacárido se hace

reaccionar con aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05 o 0,1 equivalentes molares de compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable.

En un aspecto adicional, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano. En otro aspecto, el sacárido es un oligosacárido o polisacárido derivado sintéticamente. En un aspecto, el polisacárido capsular se deriva de *S. pneumonia* (Pn). En un aspecto adicional, el polisacárido capsular se selecciona entre los polisacáridos capsulares de Pn-serotipo 10A, Pn-serotipo 12F, y Pn-serotipo 33F. Por ejemplo, en un aspecto, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular de Pn-serotipo 12F.

En un aspecto adicional, el polisacárido capsular se deriva de *N. meningitidis.* En un aspecto, el polisacárido capsular se selecciona entre los polisacáridos capsulares (Mn)-serotipo A, C, W135 e Y meningocócicos.

En un aspecto adicional, el polisacárido capsular es el polisacárido capsular (Mn)-serotipo X meningocócico.

En un aspecto adicional, el polisacárido capsular se deriva de *Streptococcus Grupo B (GBS).* En un aspecto, el polisacárido capsular se selecciona entre los serotipos GBS Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona cualquiera de los procedimientos desvelados en el presente documento en los que la proteína transportadora es una toxina del tétanos, difteria, pertussis, *Pseudomonas, E. coli, Staphylococcus* o *Streptococcus.* En un aspecto, la proteína transportadora es CRM_{197}.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento como se describe en el presente documento, en el que antes de la etapa a), el sacárido se hidroliza hasta un peso molecular que varía de 100 a 400 kDa. Por ejemplo, en un aspecto, el peso molecular varía de 100 a 350 kDa, de 100 a 300 kDa, de 100 a 250 kDa, de 100 a 200 kDa, de 100 a 150 kDa, de 200 a 400 kDa, de 200 a 350 kDa, de 200 a 300 kDa, de 200 a 250 kDa, de 300 a 400 kDa, o de 300 a 350 kDa.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona cualquiera de los procedimientos proporcionados en el presente documento que comprenden además la etapa de purificar el polisacárido activado antes de la etapa b). En un aspecto adicional, los procedimientos comprenden además la etapa de añadir un agente reductor tras la etapa b). En un aspecto, el agente reductor es $NaCNBH_3$. En un aspecto adicional, los procedimientos comprenden además la etapa de añadir $NaBH_4$ tras la adición de $NaCNBH_3$. En un aspecto adicional, el procedimiento comprende una etapa de purificación tras la adición de $NaBH_4$.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un glucoconjugado producido, u obtenible mediante cualquiera de los procedimientos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado a una proteína transportadora que se produce o es obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un disolvente acuoso para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina. En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado a una proteína transportadora que se produce o es obtenible mediante el procedimiento que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un compuesto de radical de nitroxilo o nitróxido estable y un oxidante para producir un sacárido activado que contiene grupos aldehído; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina. Los compuestos de radical de nitroxilo estables y el oxidante pueden ser como se define en las páginas 2-4 anteriores.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende cualquiera de los glicoconjugados desvelados en el presente documento y un excipiente, transportador, o diluyente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional, la composición inmunógena comprende un antígeno adicional. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un antígeno proteico o un glucoconjugado de un polisacárido capsular derivado de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, en un aspecto, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular seleccionado entre los polisacáridos capsulares de Pn-serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, y 23F. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un antígeno proteico o un glucoconjugado de un polisacárido capsular derivado de *N. meningitidis*. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular seleccionado entre los polisacáridos capsulares serotipos A, C, W135 e Y. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular de los polisacáridos capsulares serotipo X. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus (GBS) Grupo B.* En un aspecto, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular seleccionado entre GBS serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento, que comprende adicionalmente un adyuvante. En un aspecto, el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio. En un aspecto adicional, el adyuvante a base de aluminio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la mejora

de una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento. En un aspecto, la infección, enfermedad o dolencia está asociada con la bacteria *S. pneumoniae*. En un aspecto adicional, la infección, enfermedad o dolencia está asociada con la bacteria *N. meningitidis*.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunoprotectora en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende Pn-serotipo 12F conjugado a una proteína transportadora en la que el conjugado es estable. Por ejemplo, en un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende Pn-serotipo 12F conjugado a una proteína transportadora, en el que la cantidad del polisacárido de Pn-serotipo 12F libre en la composición es menor del 35 % después de 120 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad de polisacárido de Pn-serotipo 12F libre es menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 120 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad de polisacárido de Pn-serotipo 12F libre es menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 90 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad de polisacárido de Pn-serotipo 12F libre es menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 60 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad de polisacárido de Pn-serotipo 12F libre es menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 30 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición que comprende Pn-serotipo 3, 10A, o 33F conjugados a una proteína transportadora, en el que la cantidad del polisacárido de Pn-serotipo 3, 10A, o 33F libre, respectivamente, en la composición es menos del 35 % después 120 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad del polisacárido de Pn-serotipo 3, 10A, o 33F libre es menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 120 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad del polisacárido de Pn-serotipo 3, 10A, o 33F libre es menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 90 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad del polisacárido de Pn-serotipo 3, 10A, o 33F libre es menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 60 días desde el momento de la preparación. En un aspecto adicional, la cantidad del polisacárido de Pn-serotipo 3, 10A, o 33F libre es menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 28 %, menos del 27 %, menor del 26 %, o menos del 25 % después de 30 días desde el momento de la preparación. En un aspecto, se midió la cantidad de polisacárido libre, como se ha descrito anteriormente a 25 °C. En un aspecto, la proteína transportadora en las composiciones desveladas anteriormente es una toxina del tétanos, difteria, pertussis, *Pseudomonas, E. coli, Staphylococcus* o *Streptococcus.* En un aspecto adicional, la proteína transportadora es CRM_{197}.

La presente divulgación proporciona además una composición inmunógena que comprende cualquiera de dichos glucoconjugados desvelados anteriormente y un excipiente, transportador, o diluyente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional, dichas composiciones inmunógenas comprende un antígeno adicional. Por ejemplo, en un aspecto el antígeno adicional comprende un antígeno proteico o un glucoconjugado de un polisacárido capsular derivado de *S. pneumoniae*. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular seleccionado entre los polisacáridos capsulares de Pn-serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, y 23F. En otro aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un antígeno proteico o un glucoconjugado de un polisacárido capsular derivado de *N. meningitidis*. En otro aspecto más adicional, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular seleccionado entre los polisacáridos capsulares serotipos A, C, W135 e Y. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular de los polisacáridos capsulares serotipo X. En un aspecto adicional, el antígeno adicional comprende un glucoconjugado de un polisacárido capsular de *Streptococcus (GBS) Grupo B.* En un aspecto, el polisacárido capsular se selecciona entre los serotipos GBS Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII.

En otro aspecto adicional, dichas composiciones inmunógenas comprenden además un adyuvante. Por ejemplo, en un aspecto, el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio. En un aspecto adicional, el adyuvante a base de aluminio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura del polisacárido capsular de Pn-serotipo 12F.
La Figura 2 muestra la dependencia de N-Clorosuccinimida en la reacción de oxidación Tempo/NCS sobre el grado de oxidación (DO).
La Figura 3 muestra la estructura del polisacárido capsular de Pn-serotipo 10A.
La Figura 4 muestra la estructura del polisacárido capsular de Pn-serotipo 33F.
La Figura 5 muestra la estructura del polisacárido capsular de Pn-serotipo 3.
La Figura 6 muestra el posible mecanismo de oxidación/conjugación de Pn-serotipo 12F utilizando TEMPO/NCS.
La Figura 7 muestra la comparación de estabilidades de los conjugados de Pn-serotipo 12F preparados usando la oxidación del peryodato frente a la oxidación de TEMPO/NCS.

Descripción detallada

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

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias plurales salvo se indique otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias "al procedimiento" incluyen uno o más procedimiento, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes a las personas normalmente expertas en la materia tras la lectura de esta divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor, tal como un intervalo de concentración establecido, marco temporal, peso molecular, temperatura o pH. Dicho intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, típicamente en el 20 %, más normalmente en un 10% e incluso más normalmente en un 5% o en un 1% de un valor o intervalo dado. A veces, dicho intervalo puede estar dentro del error experimental típico de los procedimientos convencionales usados para la medición y/o para la determinación de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por el término "aproximadamente" dependerá del sistema particular bajo estudio, y la puede apreciar fácilmente una persona normalmente experta en la materia. Cuando se indique un intervalo en la presente solicitud, cada número entero completo en el intervalo también se contempla como una realización de la divulgación.

Cabe destacar que en la presente divulgación, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener el significado atribuido a los mismos en la ley de patentes de los EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares. Dichos términos se refieren a la inclusión de ingredientes concretos o de un conjunto de ingredientes sin excluir ningún otro ingrediente. Las expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado atribuido a las mismas en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no restan valor a las características novedosas o básicas de la divulgación, es decir, excluyen ingredientes o etapas adicionales no indicados que restan valor a las características novedosa o básicas de la divulgación. Los términos "·consiste en" y "que consiste en" tienen el significado atribuido a los mismos en la ley de patentes de Estados Unidos; concretamente, que estos términos son cerrados. Por consiguiente, estos términos se refieren a la inclusión de un ingrediente particular o de un conjunto de ingredientes y la exclusión de los otros ingredientes.

Como se usa en el presente documento, El término "sacárido" se puede usar para referirse a un polisacárido, un oligosacárido o un monosacárido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grado de oxidación" en referencia a un sacárido se refiere a la relación de moles de la unidad de repetición de sacárido por mol de aldehído. Se puede determinar el grado de oxidación de un sacárido usando procedimientos rutinarios conocidos por un experto en la materia.

Los términos "conjugados" o "glucoconjugados" como se en el presente documento se refieren a un sacárido conjugado de manera covalente a una proteína transportadora. Los glucoconjugados de la divulgación y las composiciones inmunógenas que los comprenden pueden contener alguna cantidad del sacárido libre.
La expresión "sacárido libre" como se usa en el presente documento significa un sacárido que no está conjugado covalentemente a la proteína transportadora, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado de manera no covalente con (es decir, unido de manera no covalente a, adsorbido a, o atrapado en o con) el glucoconjugado sacárido conjugado-proteína transportadora. Las expresiones "polisacárido libre" y "polisacárido capsular libre" se pueden usar en el presente documento para transmitir el mismo significado con respecto a glucoconjugados en los que el sacárido es un polisacárido o un polisacárido capsular, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, "conjugar", "conjugado" y "conjugación" se refiere a un procedimiento mediante el cual un sacárido, por ejemplo, un polisacárido capsular bacteriano, se une covalentemente a una molécula de vehículo o a una proteína de vehículo. La conjugación se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación o mediante otros procedimientos conocidos en la materia. La conjugación potencia la inmunogenicidad del polisacárido capsular bacteriano.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, incluyendo un ser humano, o un pájaro, pez, reptil, anfibio o cualquier otro animal. El término "sujeto" incluye también animales domésticos o animales de investigación. Los ejemplos no limitantes de animales domésticos y animales de investigación incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, jerbos, hámsteres, cobayas, hurones, monos, aves, serpientes, lagartos, pez, tortugas, y ranas. El término "sujeto"

incluye también animales de ganadería. Los ejemplos no limitantes de animales de ganadería incluyen: alpaca, bisontes, camello, ganado bovino, ciervos, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, renos, yaks, pollos, gansos, y pavos.

Glucoconjugados

La presente divulgación se refiere a procedimientos para preparar glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado a una proteína transportadora, en particular, usando un compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable, para oxidar selectivamente los alcoholes primarios del sacárido a aldehídos, usando además un oxidante. En un aspecto, dichos compuestos de radicales nitroxilo o nitróxido estables son los compuestos de piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi. Preferentemente, dichos compuestos tienen la capacidad de oxidar selectivamente los alcoholes primarios a aldehídos en presencia de un oxidante, sin sobreoxidación a ácidos carboxílicos y sin afectar los grupos hidroxilo secundarios. En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es una molécula que transporta un resto TEMPO o un resto PROXYL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi). Preferentemente, dicha molécula tiene la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin afectar a los grupos hidroxilo secundarios. Más preferentemente dicha molécula tiene la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin sobreoxidación de los grupos carboxilo. En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable se selecciona entre los grupos que consisten en TEMPO, 2,2,6,6-Tetrametil-4-(metilsulfoniloxi)-1-piperidinoxi, 4-fosfonoxi-TEMPO, 4-Oxo-TEMPO, 4-Metoxi-TEMPO, 4-Isotiocianato-TEMPO, 4-(2-Yodoacetamido)-radical libre TEMPO, 4-Hidroxi-TEMPO, 4-Ciano-TEMPO, 4-Carboxi-TEMPO, 4-(2-Bromoacetamido)-TEMPO, 4-Amino-TEMPO, 4-Acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxilo. preferentemente, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO. En un aspecto adicional, dicho compuesto de radical nitroxilo estable se selecciona entre los grupos que consisten en 3β-DOXYL-5α-colestano, 5-DOXYL-ácido esteárico, 16-DOXYL-ácido esteárico, 5-DOXYL-estearato de metilo, 3-(Aminometil)-PROXYL, 3-Carbamoil-PROXYL, 3-Carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxilo, 3-Carboxi-PROXYL, 3-Ciano-PROXYL. En un aspecto, el oxidante es una molécula que transporta un resto N-halo. Preferentemente, dicha molécula tiene la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un compuesto de radical nitroxilo. En un aspecto, dicho oxidante se selecciona entre el grupo que consiste en N-Clorosuccinimida, N-Bromosuccinimida, N-Yodosuccinimida, Ácido dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, Ácido dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, Ácido diiodoisocianúrico y 1,3,5-triyodo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona. Preferentemente, dicho oxidante es N-Clorosuccinimida.

En un aspecto, La presente divulgación se refiere a procedimientos para preparar glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado a una proteína transportadora, en particular utilizando el radical libre 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) para oxidar los alcoholes primarios del sacárido a los aldehídos usando N-Clorosuccinimida (NCS) como el oxidante auxiliar.

En los glucoconjugados de la divulgación, el sacárido se selecciona entre el grupo que consiste en un polisacárido, un oligosacárido, y un monosacárido, y la proteína transportadora se selecciona entre cualquier transportador adecuado tal como se describe adicionalmente en el presente documento o es sabido por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el sacárido es un polisacárido, en particular, un polisacárido capsular bacteriano, tal como *Streptococcus pneumoniae* de serotipo 10A (de Pn-serotipo 10A), de Pn-serotipo 12F, o de Pn-serotipo 33F. En algunas de tales realizaciones, la proteína transportadora es CRM_{197}.

Se pueden preparar polisacáridos capsulares mediante técnicas normalizadas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden preparar polisacáridos capsulares de una variedad de serotipos, tales como 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *Streptococcus pneumoniae.* Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procedimientos separados y se formulan en una formulación en dosis individual. Por ejemplo, en una realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico se hace crecer en un medio basado en soja. A continuación, los polisacáridos individuales se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración, y cromatografía en columna. Los polisacáridos purificados se activan químicamente para preparar los sacáridos (es decir, los sacáridos activados) capaces de reaccionar con la proteína transportadora. Una vez activados, cada polisacárido capsular se conjuga por separado a una proteína transportadora para formar un glucoconjugado. En una realización, cada polisacárido capsular se conjuga a la misma proteína transportadora. La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación a la proteína transportadora se pueden conseguir por medios convencionales. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.673.574, 4.902.506, 7.709.001 y 7.955.605.

En una realización, el glucoconjugado de la divulgación tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 20.000 kDa. En otra realización, el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 10.000 kDa. En otra realización, el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 5.000 kDa. En una realización, el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 3,000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 600 kDa y aproximadamente 2800 kDa; entre aproximadamente 700 kDa y aproximadamente 2700 kDa; entre aproximadamente 1000 kDa y aproximadamente 2000 kDa; entre aproximadamente 1800 kDa y aproximadamente 2500 kDa; entre aproximadamente 1100 kDa y aproximadamente 2200 kDa; entre aproximadamente 1900 kDa y aproximadamente 2700 kDa; entre

aproximadamente 1200 kDa y aproximadamente 2400 kDa; entre aproximadamente 1700 kDa y aproximadamente 2600 kDa; entre aproximadamente 1300 kDa y aproximadamente 2600 kDa; entre aproximadamente 1600 kDa y aproximadamente 3000 kDa. Cualquier número entero completo en cualquiera de los anteriores intervalos se contempla como una realización de la divulgación.

Las novedosas características de los glucoconjugados de la divulgación incluyen los perfiles de pesos moleculares de los sacáridos y los conjugados resultantes, la relación de las lisinas conjugadas por proteína transportadora y el número de lisinas unidas covalentemente al polisacárido, el número de enlaces covalentes entre la proteína transportadora y el sacárido como una función de las unidades de repetición del sacárido, y la cantidad relativa de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido.

En otra realización, el polisacárido es un polisacárido capsular derivado de *Neisseria meningitidis.* En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular se selecciona entre el grupo de polisacáridos capsulares de serotipo A, B, C, W135, X e Y de *N. meningitidis.* En una de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular de serotipo C. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular de serotipo W135. En otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular de serotipo Y.

En algunas realizaciones, el glucoconjugado de la divulgación comprende un polisacárido capsular bacteriano, en el que el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa o entre 50 kDa y 1.000 kDa. En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular se deriva de *S. pneumoniae* o de N. *meningitidis.* En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular se deriva de *S. pneumoniae* y se selecciona entre el grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otras de estas realizaciones, el polisacárido capsular se deriva de *N. meningitidis* y se selecciona entre el grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de serotipo A, B, C, W135, X e Y.

En una realización, la divulgación proporciona un glucoconjugado que comprende un polisacárido capsular conjugado covalentemente a una proteína transportadora, que tiene una o más de las siguientes características: el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa; el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa a 3.000 kDa; y el conjugado comprende menos de aproximadamente el 45 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total. En algunas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En algunas realizaciones, el que el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el conjugado comprende menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, o 5 % de polisacárido libre con respecto al polisacárido total. Se puede medir la cantidad de polisacárido libre como una función del tiempo, por ejemplo, después de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 120 días, o incluso más, después de prepararse el conjugado.

El número de restos de lisina en la proteína transportadora conjugada al sacárido se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas, que puede expresarse como una relación molar. Por ejemplo, en una composición inmunógena donde 4 a 15 restos de lisina de CRM_{197} están unidos covalentemente al sacárido, la relación molar de las lisinas conjugadas a CRM_{197} en el glucoconjugado está entre aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1. En una composición inmunógena donde de 2 a 20 restos de lisina de CRM_{197} están unidos covalentemente al sacárido, la relación molar de las lisinas conjugadas a CRM_{197} en el glucoconjugado está entre aproximadamente 5:1 a aproximadamente 50:1.

En una realización, la relación molar de las lisinas conjugadas a la proteína transportadora es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1. En algunas de tales realizaciones, la proteína transportadora es CRM_{197}. En una realización, la relación del sacárido:proteína transportadora (en p/p) está entre 0,2 y 4. En otra realización, la relación del sacárido:proteína transportadora (en p/p) está entre 1,1 y 1,7. En algunas realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, y la relación del sacárido:proteína transportadora (en p/p) está entre 0,2 y 4. En otras realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, y la relación del sacárido:proteína transportadora (en p/p) está entre 1,1 y 1,7. En algunas de tales realizaciones, la proteína transportadora es CRM_{197}.

La frecuencia de unión de la cadena de sacáridos a una lisina en la proteína transportadora es otro parámetro para caracterizar los glucoconjugados de la divulgación. Por ejemplo, en una realización, existe al menos un enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido por cada 100 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, existe al menos un enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido por cada 50 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, existe al menos un enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido por cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido tiene lugar al menos una vez en cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido tiene lugar al menos una vez en cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido tiene lugar al menos una vez en cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

En realizaciones frecuentes, la proteína transportadora es CRM_{197} y el enlace covalente entre la CRM_{197} y el polisacárido tiene lugar al menos una vez en cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas de tales realizaciones, el polisacárido es un polisacárido capsular bacteriano, por ejemplo, un polisacárido

capsular bacteriano derivado de las bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* bacteria.

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

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

En una realización, el glucoconjugado de la divulgación comprende al menos un enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido por cada 25 unidades de repetición del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido tiene lugar al menos una vez en cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido tiene lugar al menos una vez en cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido tiene lugar al menos una vez en cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

En una realización, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente 45 % de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido. En otra realización, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente 30 % de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido. En otra realización, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente 20 % de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido. En una realización adicional, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente 10 % de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido. En otra realización, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente 5 % de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido.

En otra realización, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente 20 % en moles de restos de proteína transportadora en comparación con la cantidad total de glucoconjugado.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende un glucoconjugado de la divulgación y al menos uno de un adyuvante, diluyente o transportador.
En una realización, la divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende un glucoconjugado de la divulgación y al menos uno de un adyuvante, diluyente o transportador, en el que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano conjugado covalentemente a una proteína transportadora. En algunas de tales realizaciones, el polisacárido capsular se deriva de *S. pneumoniae* o de N. *meningitidis.*

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

En algunas realizaciones, los glucoconjugados o las composiciones inmunogénicas de la divulgación se pueden usar para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide mediante la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

En una realización, la divulgación proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra una bacteria patógena en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir o mejorar una enfermedad o dolencia producidas por una bacteria patógena en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad o dolencia producida por una bacteria patógena en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la bacteria patógena es *S. pneumoniae* o *N. meningitidis.*

Además, la presente divulgación proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria contra bacterias de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis*, procedimientos para prevenir una enfermedad causada por bacterias de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis*, y procedimientos para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad

producida por una infección por bacterias de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis*.

Sacáridos

Los sacáridos incluyen polisacáridos, oligosacáridos y monosacáridos. En algunas realizaciones, el sacárido es un polisacárido, en particular, un polisacárido capsular bacteriano.

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

En una realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En una realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otra realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 300 kDa. En otra realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa. En realizaciones adicionales, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 90 kDa y 250 kDa; 90 kDa a 150 kDa; 90 kDa a 120 kDa; 80 kDa a 120 kDa; 70 kDa a 100 kDa; 70 kDa a 110 kDa; 70 kDa a 120 kDa; 70 kDa a 130 kDa; 70 kDa a 140 kDa; 70 kDa a 150 kDa; 70 kDa a 160 kDa; 80 kDa a 110 kDa; 80 kDa a 120 kDa; 80 kDa a 130 kDa; 80 kDa a 140 kDa; 80 kDa a 150 kDa; 80 kDa a 160 kDa; 90 kDa a 110 kDa; 90 kDa a 120 kDa; 90 kDa a 130 kDa; 90 kDa a 140 kDa; 90 kDa a 150 kDa; 90 kDa a 160 kDa; 100 kDa a 120 kDa; 100 kDa a 130 kDa; 100 kDa a 140 kDa; 100 kDa a 150 kDa; 100 kDa a 160 kDa; e intervalos de peso molecular similares deseados. Cualquier número entero completo en cualquiera de los anteriores intervalos se contempla como una realización de la divulgación.

El polisacárido capsular de *S. pneumoniae,* Serotipo 12F (Pn-serotipo 12F) tiene la estructura que muestra la Figura 1. El polisacárido capsular de *S. pneumoniae,* Serotipo 10A (Pn-serotipo 10A) tiene la estructura que muestra la Figura 3. El polisacárido capsular de *S. pneumoniae,* Serotipo 33F (Pn-serotipo 33F) tiene la estructura que muestra la Figura 4. El polisacárido capsular de *S. pneumoniae,* Serotipo 3 (Pn-serotipo 3) tiene la estructura que muestra la Figura 5.

En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares, glucoconjugados o composiciones inmunógenas de la divulgación se utilizan para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide mediante la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que demuestra que los anticuerpos eliminan las bacterias. Los polisacáridos capsulares se pueden obtener directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por el experto en la materia. Véanse, por ejemplo, Fournier *y col.* (1984), *supra;* Fournier y col. (1987) Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:561-567; publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º, 2007/0141077; y la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 00/56357). Además, se pueden producir usando protocolos sintéticos. Por otra parte, el polisacárido capsular se puede producir de forma recombinante usando procedimientos de ingeniería genética también conocidos del experto en la materia (véase Sau y col. (1997) Microbiology 143:2395-2405; y la patente de Estados Unidos N.º 6.027.925). Las cepas de *S. pneumoniae* o *N. menigitidis* se pueden usar para preparar los respectivos polisacáridos que se obtienen bien a partir de colecciones de cultivos establecidos o a partir de especímenes clínicos.

Proteínas transportadoras

Otro componente del glucoconjugado de la divulgación es una proteína transportadora con la que se conjuga el sacárido. La expresión "transportador proteico" o "proteína transportadora" o "transportador" se refiere a cualquier molécula de proteína que se puede conjugar con un antígeno (tal como un polisacárido capsular) contra el que se desea suscitar una respuesta inmunitaria.

La conjugación con un transportador puede mejorar la inmunogenicidad del antígeno. Las proteínas transportadoras de antígenos pueden ser toxinas, toxoides o cualquier material de reacción cruzada (CRM) procedente de la toxina del tétanos, difteria, pertussis, *Pseudomonas, E. coli, Staphylococcus* y *Streptococcus*. En una realización, un transportador es el toxoide diftérico CRM_{197}, derivado de la cepa C7 (β197) de *C. diphtheriae*, que produce la proteína CRM_{197}. La cepa tiene un N.º de referencia de ATCC 53281. Un procedimiento para producir CRM_{197} se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.614.382, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Como alternativa, se puede usar un fragmento o epítopo del transportador proteico u otra proteína inmunógena. Por ejemplo, se puede acoplar un antígeno hapténico a un epítopo de linfocitos T de una toxina, toxoide o CRM de origen bacteriano. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivas tales como el toxoide del cólera (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*. Las proteínas de la membrana externa bacteriana tales como el complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína A de la superficie neumocócica (PspA), proteína de adhesión neumocócica (PsaA) o proteína D de *Haemophilus influenzae* también son de utilidad. Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) también se pueden usar como proteínas transportadoras.

Como se ha analizado anteriormente en el presente documento, el número de restos de lisina en la proteína

transportadora que quedan conjugados con el sacárido se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 1 a 15 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que desde aproximadamente el 2,5 % a aproximadamente el 40 % de las lisinas de CRM_{197} están enlazadas covalentemente al sacárido. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 1 a 20 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que desde aproximadamente el 2,5 % a aproximadamente el 50 % de las lisinas de CRM_{197} están enlazadas covalentemente al sacárido.

Procedimientos para preparar glucoconjugados

Para preparar un glucoconjugado, el polisacárido debe activarse primero (es decir, modificarse químicamente) antes de que se pueda unir químicamente a un transportador, tal como una proteína. Antes de la etapa de activación, los sacáridos se pueden hidrolizar o tamizarse mecánicamente mediante homogeneización por presión para conseguir los pesos moleculares adecuados (por ejemplo, de 50 kDa a 500 kDa) para su activación y posterior conjugación. La oxidación parcial de los carbohidratos para dar polisacáridos se ha utilizado eficazmente para generar grupos aldehído que posteriormente se acoplan a grupos amina, tales como los restos de lisina de las proteínas transportadoras, para generar complejos inmunogénicos. Es importante que el procedimiento utilizado para conjugar un polisacárido a una proteína transportadora de como resultado un enlace covalente estable, y que las condiciones de reacción sean lo suficientemente suaves para mantener la integridad estructural de los componentes individuales. Los procedimientos utilizados habitualmente para activar y acoplar los polisacáridos a proteínas transportadoras incluyen química de aminación reductora (RAC), cianilación, y el uso de carbodiimida. La aminación reductora implica de forma típica el uso de peryodato de sodio o potasio o de ácido peryódico para oxidar selectivamente los grupos -OH próximos a grupos aldehído activos. La cianilación se utiliza para convertir aleatoriamente grupos -OH en grupos -CN activos. La carbodiimida se utiliza para activar los grupos carboxilo sustituyendo los grupos -OH por carbodiimida.

La química de aminación reductora (RAC) es uno de los procedimientos más utilizados para acoplar polisacáridos a proteínas ya que la reacción entre el grupo carbonilo resultante del polisacárido y el grupo amino de la proteína transportadora pueden formar la correspondiente base de Schiff, que se puede reducir selectivamente en presencia de cianoborohidruro de sodio ($NaCNBH_3$) a un enlace carbono-nitrógeno saturado muy estable. Además, la aminación reductora se puede llevar a cabo en solución acuosa en condiciones lo suficientemente suaves para preservar la integridad estructural de las condiciones de sacárido y proteína. Tras la conjugación, los aldehídos sin reaccionar se pueden proteger después mediante reducción con borohidruro de sodio ($NaBH_4$). Después, el conjugado se puede purificar (por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración), proporcionando un glucoconjugado voluminoso final en solución salina tamponada con succinato.

Sin embargo, dependiendo del polisacárido en particular, el uso de los procedimientos habituales anteriormente señalados no siempre proporciona resultados adecuados. Por ejemplo, la oxidación directa de polisacáridos con peryodato de sodio puede dar como resultado la escisión de la estructura principal del polisacárido.

Por ejemplo, se ha observado que, para los conjugados preparados usando condiciones convencionales de oxidación con peryodato (seguido de aminación reductora), los lotes representativos mostraron un aumento de polisacárido libre y una reducción en el peso molecular, a 25 °C y superior. La presente divulgación proporciona el hallazgo de que el uso de un procedimiento de oxidación basado en una sal de N-oxoamonio da como resultado una estabilidad mejorada de diversos conjugados de polisacáridos de *S. pneumoniae*, especialmente el Serotipo 12F. En particular, como se muestra más detalladamente en los Ejemplos 1 a 7, el radical libre 2,2,6,6,-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) se usó junto con N-clorosuccinimida (NCS) para oxidar eficazmente los grupos hidroxilo primarios de los Serotipos 12F, 10A, 3 y 33F para mejorar la estabilidad de los conjugados resultantes. Aunque la oxidación selectiva de los alcoholes primarios para dar aldehídos usando TEMPO/NCS se ha mostrado en el contexto de las reacciones químicas orgánicas que utilizan moléculas pequeñas en disolventes orgánicos (véase, por ejemplo, Einhorn y col., J. Org. Chem. 61, págs. 7452-7454 (1996)), la presente divulgación proporciona el hallazgo novedoso de que TEMPO/NCS se puede usar como agente oxidante para oxidar selectivamente polisacáridos complejos en solución acuosa para producir conjugados estables de proteínas y polisacáridos.

Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado a una proteína transportadora, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un compuesto de radical nitroxilo estable y un oxidante para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina.

En un aspecto, los grupos aldehído sin reaccionar se convierten posteriormente en alcoholes primarios durante la etapa de protección, usando borohidruro, tras la conjugación con la proteína transportadora, minimizando por tanto la modificación del epítopo del sacárido durante las etapas de modificación que implican la oxidación seguida por conjugación.

En un aspecto, la etapa a) de la reacción se lleva a cabo en un disolvente acuoso. En otro aspecto, la etapa a) se lleva a cabo en un disolvente aprótico. En un aspecto, la etapa a) se lleva a cabo en DMSO (dimetilsulfóxido), Dimetilacetamida (DMA), Sulfolano, N-Metil-2-pirrolidona (NMP), Hexametilfosforamida (HMPA) o en disolvente DMF

(dimetilformamida).

En un aspecto, dichos compuestos de radicales nitroxilo o nitróxido estables son los compuestos de piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi. Preferentemente, dichos compuestos tienen la capacidad de oxidar selectivamente los alcoholes primarios en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin afectar a los grupos hidroxilo secundarios. Más preferentemente, dichos compuestos tienen la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin sobreoxidación de los grupos carboxilo. En una realización, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es una molécula que transporta un resto TEMPO o un resto PROXYL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi). Preferentemente, dicha molécula tiene la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin afectar a los grupos hidroxilo secundarios. Más preferentemente dicha molécula tiene la capacidad de oxidar selectivamente alcoholes primarios en presencia de un oxidante, para generar grupos aldehído, sin sobreoxidación de los grupos carboxilo. En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO o un derivado del mismo. En una realización, dicho compuesto de radical nitroxilo estable se selecciona entre los grupos que consisten en TEMPO, 2,2,6,6-Tetrametil-4-(metilsulfoniloxi)-1-piperidinoxi, 4-fosfonoxi-TEMPO, 4-Oxo-TEMPO, 4-Metoxi-TEMPO, 4-Isotiocianato-TEMPO, 4-(2-Yodoacetamido)-radical libre TEMPO, 4-Hidroxi-TEMPO, 4-Ciano-TEMPO, 4-Carboxi-TEMPO, 4-(2-Bromoacetamido)-TEMPO, 4-Amino-TEMPO, 4-Acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxilo. preferentemente, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO. En una realización adicional, dicho compuesto de radical nitroxilo estable se selecciona entre los grupos que consisten en 3β-DOXYL-5α-colestano, 5-DOXYL-ácido esteárico, 16-DOXYL-ácido esteárico, 5-DOXYL-estearato de metilo, 3-(Aminometil)-PROXYL, 3-Carbamoil-PROXYL, 3-Carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxilo, 3-Carboxi-PROXYL, 3-Ciano-PROXYL. En una realización, dicho oxidante es una molécula que transporta un resto N-halo. Preferentemente, dicha molécula tiene la capacidad de oxidar selectivamente el alcohol primario en presencia de un compuesto de radical nitroxilo. En una realización, dicho oxidante se selecciona entre el grupo que consiste en N-Clorosuccinimida, N-Bromosuccinimida, N-yodosuccinimida, Ácido dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, Ácido dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, Ácido diiodoisocianúrico y 1,3,5-triyodo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona. Preferentemente, dicho oxidante es N-Clorosuccinimida.

En un aspecto, el sacárido se hace reaccionar con 0,1 a 10 equivalentes molares de oxidante. Preferentemente, el sacárido se hace reaccionar con 0,2 a 5, 0,5 a 2,5 o 0,5 a 1,5 equivalentes molares de oxidante. En un aspecto, el polisacárido se hace reaccionar con aproximadamente 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 o 5 equivalentes molares de oxidante.

En un aspecto, el compuesto de radical de nitroxilo estable está presente en una cantidad catalítica. En un aspecto, el sacárido se hace reaccionar con menos de aproximadamente 0,3 equivalentes molares de compuesto de radical nitroxilo estable. En un aspecto, el sacárido se hace reaccionar con menos de aproximadamente 0,005 equivalentes molares de compuesto de radical nitroxilo estable. En un aspecto, el sacárido se hace reaccionar con aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05 o 0,1 equivalentes molares de compuesto de radical nitroxilo estable.

En una realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado a una proteína transportadora, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un disolvente acuoso para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina.

En otras realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de purificación del glucoconjugado, por ejemplo, por diafiltración.

En cada caso, el sacárido se selecciona entre el grupo que consiste en un polisacárido, un oligosacárido y un monosacárido.

En cada caso, dicho sacárido se puede purificar a partir del medio de fermentación o se puede derivar sintéticamente.

En realizaciones frecuentes, la proteína transportadora es CRM_{197}. En una realización, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular derivado de *S. pneumoniae*. En otra realización preferida, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular derivado de *N. meningitidis*.

En una realización, el procedimiento para producir un glucoconjugado de la divulgación comprende la etapa de aislar el conjugado sacárido tiolado-proteína de vehículo después de que se produce. En realizaciones frecuentes, el glucoconjugado se aísla mediante ultrafiltración.

En una realización, la proteína transportadora utilizada en el procedimiento para producir un conjugado de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*-proteína transportadora aislado comprende CRM_{197}. En una realización, la proteína transportadora utilizada en el procedimiento para producir un conjugado de polisacárido capsular de *N. meningitidis*-proteína transportadora aislado comprende CRM_{197}.

En una realización, la CRM_{197} se hace reaccionar con el polisacárido activado en una proporción en peso de aproximadamente 1:1.

En una realización, el procedimiento para producir un conjugado de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*:proteína transportadora aislado comprende la etapa de proteger la mezcla de reacción de conjugado de polisacárido:proteína transportadora para eliminar los grupos de activación que no han reaccionado.

En una realización, la CRM_{197} del procedimiento para producir el conjugado de polisacárido-CRM_{197} se añade en una relación en peso de aproximadamente 0,4:1 CRM_{197}:molécula de polisacárido capsular. En otras realizaciones, la relación en peso de CRM_{197}:polisacárido capsular es de aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 0,6:1, aproximadamente 0,7:1, aproximadamente 0,8:1, aproximadamente 0,9:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1,1:1, aproximadamente 1,2:1, aproximadamente 1,3:1, aproximadamente 1.4:1, o aproximadamente 1,5:1.

En una realización, el sacárido usado en el procedimiento de producción del glucoconjugado de la divulgación tiene un peso molecular de entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 2.000 kDa. En otras realizaciones, el peso molecular está comprendido entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 1.000 kDa, entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 20.000 kDa, entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 10.000 kDa, entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 3.000 kDa.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende un glucoconjugado producido mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende un glucoconjugado que se puede obtener por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Composiciones inmunógenas

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

Como se usa en el presente documento, "inmunógena" significa una capacidad de un antígeno (o un epítopo del antígeno), tal como un polisacárido capsular bacteriano, o un glucoconjugado o composición inmunógena que comprende el antígeno, para desencadenar una respuesta inmunitaria en un hospedador tal como un mamífero, tanto humoral como celular, o ambas.

Por consiguiente, un "glucoconjugado" o "conjugado", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier glucoconjugado que contenga un antígeno o determinante antigénico (es decir, un epítopo) de un polisacárido capsular bacteriano conjugado con una molécula transportadora que se puede utilizar para desencadenar una respuesta inmunitaria.

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

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de manera específica a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, salvo que el contexto indique otra cosa, el término pretende abarcar no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos diseñados genéticamente (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivatizados para alterar las funciones efectoras, la estabilidad y otras actividades biológicas) y los fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), anticuerpos monocatenarios (ScFv) y anticuerpos de dominio, incluyendo anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos tal como se describe en el presente documento, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclases de las mismas), y el anticuerpo no tiene que ser de ninguna clase en particular. Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en seres humanos. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de la subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

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

El término "antígeno" generalmente se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido o conjugado en una composición inmunógena o una sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o de respuestas de linfocitos T, o ambas, en un animal, incluidas las composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria se puede generar para la molécula completa o para diversas porciones de la molécula (por ejemplo, un epítopo o hapteno). El término se puede usar para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno es reconocido por los anticuerpos, los receptores de los linfocitos T u otros elementos de inmunidad humoral y/o celular específica. "Antígeno" también incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos de un antígeno dado se pueden identificar usando cualquiera de las técnicas de cartografiado de epítopos, bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J. Por ejemplo, los epítopos lineales se pueden determinar mediante, por ejemplo, la síntesis paralela de grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, hacer corresponder los péptidos con porciones de la molécula proteica, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos siguen unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la materia y se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4,708,871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De manera similar, los epítopos conformacionales se pueden identificar mediante la determinación de la conformación espacial de los aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véanse, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, citado anteriormente.

Además, para los fines de la presente divulgación, "antígeno" también se puede usar para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de tipo conservativo, pero pueden ser no conservativas), de la secuencia natural, siempre que la proteína conserve la capacidad para desencadenar una respuesta inmunitaria. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o mediante procedimientos de síntesis particulares, o mediante una estrategia de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de los hospedadores, que producen los antígenos. Además, el antígeno se puede derivar, obtener o aislar de un microbio, por ejemplo, una bacteria o puede ser un organismo completo. De manera similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también se incluye en la definición. También se incluyen antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente (Bergmann y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann y col. (1996) J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier (1997) Immunol. Cell Biol. 75:402 408; Gardner y col. (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, del 28 de junio al 3 de julio de 1998).

Una respuesta inmunitaria "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunógena para generar una respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular, o ambas, que sirve para proteger a un sujeto frente a una infección. La protección proporcionada no tiene que ser absoluta, es decir, no se necesita que la infección se prevenga o erradique por completo, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control de los sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se les administra la vacuna o la composición inmunógena. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o la rapidez de la aparición de síntomas de la infección. Por lo general, una "respuesta inmunitaria protectora" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluido cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales mensurables para cada antígeno. En situaciones particulares, una "respuesta inmunitaria protectora" podría incluir la inducción de un aumento de dos veces de los niveles de anticuerpos o u aumento de cuatro veces de los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluido cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales mensurables para cada antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes se correlacionan con una respuesta inmunitaria protectora. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria protectora se puede someter a ensayo midiendo el porcentaje de reducción en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo, los descritos a continuación. Preferentemente, hay una reducción en el recuento de bacterias de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. La "cantidad inmunógena" de un conjugado particular en una composición generalmente se calcula basándose en el polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un polisacárido capsular con el 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 µg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 µg de polisacárido no conjugado en una dosis de 100 µg. La contribución de la proteína al conjugado normalmente no se considera cuando se calcula la dosis de un conjugado. Generalmente, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más especialmente de 1 a 10 µg.

Una realización de la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende cualquiera de los glucoconjugados que comprende un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora anteriormente descrita.

Las composiciones inmunógenas de la presente divulgación se pueden usar para proteger o tratar un ser humano susceptible a una infección bacteriana, por ejemplo, por una bacteria de *S. pneumoniae* o por una bacteria de *N. meningitidis*, mediante la administración de las composiciones inmunógenas mediante una ruta sistémica, dérmica o

mucosal, o se puede utilizar para generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales que se podrían usar para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de la vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de la administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. Las composiciones inmunógenas también se pueden usar para generar anticuerpos que son funcionales tal como se mide mediante la eliminación de bacterias en un modelo de eficacia animal o a través de un ensayo de eliminación opsonofagocítica.

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

En una realización, las composiciones inmunógenas de la divulgación comprenden al menos un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de la oxidación por radicales libres, un diluyente o vehículo. En una realización, el adyuvante contenido en la composición inmunogénica de la divulgación es un adyuvante basado en aluminio. En una realización, el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, el adyuvante es fosfato de aluminio.

Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administran junto con un inmunógeno o un antígeno. Se ha comprobado que numerosas citoquinas o linfoquinas tienen actividad inmunomoduladora y, por tanto, pueden ser útiles de una forma análoga o similares a los adyuvantes, incluyendo, aunque no de forma limitativa, las interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase,por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones a, β y γ; factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,078,996 y el número de registro de la ATCC 39900); factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF); y los factores de necrosis tumoral α y β. Otros adyuvantes adicionales que son de utilidad con las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento incluyen quimioquinas, incluidas, aunque no de forma limitativa, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES; moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas de tipo leucina, 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 y ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tales como B7-1, B7-2, CD40 y CD40L; factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1, y factor del crecimiento endotelial vascular; moléculas receptoras que incluyen Fas, receptor de TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6; y las caspasas, incluida la ICE.

Los adyuvantes adecuados utilizados para potenciar una respuesta inmunitaria pueden incluir además, aunque no de forma limitativa, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado, Corixa; Hamilton, MT), que se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes los análogos sintéticos del lípido A o compuestos de fosfato de alquilglucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles de Corixa, y los que se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.113.918. Uno de estos AGP es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranósido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula en forma acuosa (AF) o como emulsión estable (SE).

Otros adyuvantes adicionales incluyen péptidos de muramilo, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de aceite en agua, tales como MF59 (patente de Estados Unidos n.º 6.299.884) (que contiene un 5 % de escualeno, un 0,5 % de polysorbate 80, y un 0,5 % de Span 85 (conteniendo opcionalmente diferentes cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), y SAF (que contiene un 10 % de escualeno, un 0,4 % de polysorbate 80, un 5 % de polímero L121 bloqueado con pluronic, y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado vorticialmente para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula); adyuvante incompleto de Freund (IFA); sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Amphigen; Avridina; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glicósido; polioles plurónicos; *Bordetella* destruida; saponinas, tal como STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descrita en la patente de Estados Unidos n.º 5.057.540, ISCOMATRIX™ (CSL Limited, Parkville, Australia), descrita en la patente de Estados Unidos n.º 5.254.339, y complejos inmunoestimuladores (ISCOMS); *Mycobacterium tuberculosis;* lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos sintéticos tales como los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), que se describe en las patentes EP con números 1.296.713 y 1.326.634; la toxina de la tosferina (PT) o un mutante de la misma, la toxína colérica o un mutante de la misma (por ejemplo, patentes de Estados Unidos números 7.285.281; 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o una toxina de *E. coli* termolábil (LT) o un mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-R72 (por ejemplo, patentes de Estados Unidos números 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

La composición inmunógena opcionalmente puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los

vehículos farmacéuticamente aceptables autorizados por un organismo regulador de una agencia local o nacional, u otra agencia reguladora, o relacionada en la U.S. Pharmacopeia u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, incluyendo seres humanos así como mamíferos no humanos. El término vehículo se puede usar para referirse a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra la composición farmacéutica. Agua, disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol se pueden emplear como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

Las composiciones inmunógenas de la presente divulgación pueden comprender además uno o más inmunomoduladores adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmunitario, de forma que de observa una regulación por exceso o por defecto la inmunidad humoral y/o mediada por células. En una realización, se proporciona la regulación por exceso de los brazos humoral y/o mediado por células del sistema inmunitario.

Los ejemplos de algunos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citoquina, o ISCOMATRIX™ (CSL Limited; Parkville, Australia), que se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.254.339, entre otros. Los ejemplos no limitativos de los adyuvantes que se pueden usar en la composición inmunógena de la presente divulgación incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero de bloques (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 avridina (N,N-Dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-1,3-diaminopropano, adyuvante de lípido (N,N-Dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)propanodiamina)-amina. Los ejemplos no limitativos de emulsiones de aceite en agua útiles en la composición inmunógena de la divulgación incluyen formulaciones SEAM62 y SEAM 1/2 modificadas. SEAM62 modificado es una emulsión aceite/agua que contiene un 5 % (v/v) de escualeno (Sigma), 1 % (v/v) de detergente SPAN™ 85 (ICI Surfactants), 0,7 % (v/v) de detergente polysorbate 80 (ICI Surfactants), 2,5 % (v/v) de etanol, 200 µg/ml de Quil A, 100 µg/ml de colesterol, y un 0,5 % (v/v) de lecitina. SEAM 1/2 modificado es una emulsión aceite/agua que comprende un 5 % (v/v) de escualeno, 1 % (v/v) de detergente SPAN™ 85, 0,7 % (v/v) de detergente polysorbate 80, 2,5 % (v/v) de etanol, 100 µg/ml de Quil A y 50 µg/ml de colesterol. Otros inmunomoduladores que se pueden incluir en la composición inmunógena incluyen, por ejemplo, una o más interleuquinas, interferones, u otras citoquinas o quimioquinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos números 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Se debe entender que el inmunomodulador y/o el adyuvante a utilizar dependerá del sujeto al que se va a administrar la composición inmunógena, la vía de inyección y el número de inyecciones a administrar.

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

Envasado y formas de dosificación

Las formulaciones de la divulgación 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 secuestrante de radicales libres o agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La selección de cualquier componente, por ejemplo, un quelante, puede determinar si otro componente (por ejemplo, un secuestrante), es deseable o no. La composición final formulada para su administración debe ser estéril y exenta de pirógenos. El experto en la materia puede determinar empíricamente que composiciones de estos y otros componentes serán óptimas para su inclusión en las composiciones inmunógenas que contienen conservantes de la divulgación dependiendo de una variedad de factores tales como las condiciones de almacenamiento y administración concretas necesarias.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones fisiológicamente aceptables seleccionados entre, aunque no de forma limitativa, Tris (trimetanamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En ciertas realizaciones, la formulación se tampona para quedar en un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición inmunógena de o de la formulación de la divulgación. El pH de una formulación de la divulgación se puede ajustar usando técnicas convencionales en la materia. El pH de la formulación se puede ajustar para quedar comprendido entre 3,0 y 8,0. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o se puede ajustar para ser, 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 se puede ajustar para ser, aproximadamente de 3,0,

aproximadamente de 3,5, aproximadamente de 4,0, aproximadamente de 4,5, aproximadamente de 5,0, aproximadamente de 5,5, aproximadamente de 5,8, aproximadamente de 6,0, aproximadamente de 6,5, aproximadamente de 7,0, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8,0. En ciertas realizaciones, el pH puede ser, o se puede ajustar 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 ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluidos, aunque no de forma limitativa, $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$, a una concentración comprendida de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, prefiriéndose hasta aproximadamente 5 mM.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más sales, incluidas, aunque no de forma limitativa, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, y sulfato de potasio, presentan una fuerza iónica que es fisiológicamente aceptable para el sujeto tras la administración parenteral y se incluye a una concentración final para producir una fuerza iónica u osmolalidad seleccionada en la formulación final. La fuerza iónica u osmolalidad final de la formulación vendrá determinado por múltiples componentes (por ejemplo, los iones del uno o más compuestos tamponantes y otras sales no tamponantes. Una sal preferida, NaCl, está presente en un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, donde las concentraciones de sal se seleccionan para complementar otros componentes (por ejemplo azúcares) de forma que la osmolaridad total final de la formulación sea compatible con la administración parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea) y que fomente la estabilidad a largo plazo de los componentes inmunógenos de la formulación de composición inmunógena para diferentes intervalos de temperatura. Las formulaciones exentas de sales tolerarán intervalos mayores del uno o más crioprotectores para mantener los niveles de osmolaridad finales deseados.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores seleccionados, aunque no de forma limitativa, disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) e hidrocarburos polihidroxilados (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

En ciertas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está comprendida en el 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 exenta de sales puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 % de sacarosa, y preferentemente de aproximadamente 7 % a aproximadamente 15 %, o de aproximadamente 10 % a aproximadamente 12 % de sacarosa. Como alternativa, una formulación exenta de sales puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 12 % de sorbitol, y preferentemente de aproximadamente 4 % a 7 %, o de aproximadamente 5 % a aproximadamente 6 % sorbitol. Si se añade una sal como cloruro de sodio, entonces el intervalo eficaz de sacarosa o sorbitol disminuye relativamente. Estas y otras consideraciones sobre osmolalidad y osmolaridad están bien comprendidas entre los conocimientos del experto en la materia.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres y/o agentes quelantes. En la técnica se conoce una variedad de secuestrantes de radicales libres y quelantes y se aplican a las formulaciones y procedimientos de uso descritos en el presente documento. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa. etanol, EDTA, y combinación de EDTA con trietilamina, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico(succinato, ácido maleico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA, y varias combinaciones de dos o más de los anteriores. En ciertas realizaciones, al menos un secuestrante de radicales libres no reductor se puede añadir a una concentración que eficazmente potencia la estabilidad a largo plazo de la formulación. También se puede añadir uno o más inhibidores/quelantes de la oxidación por radicales libres en varias combinaciones, tal como un secuestrante y un catión divalente. La selección del quelante determinará si se necesita o no la adición de un secuestrante.

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos no iónicos, incluidos, aunque no de forma limitativa, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilenado, polysorbate-80 (TWEEN™ 80), polysorbate-60 (TWEEN™ 60), polysorbate-40 (TWEEN™ 40) y polysorbate-20 (TWEEN™ 20), alquil éteres polioxietilenados, incluidos, aunque no de forma limitativa Brij 58, Brij 35, así como otros tales como TRITON™ X-100; TRITON™ X-114, NP40 (nonil fenoxipolietoxietanol), SPAN™ 85 y la serie de tensioactivos no iónicos PLURONIC™ (por ejemplo, PLURONIC™ 121), con los componentes preferidos polysorbate-80 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente el 2 % (prefiriéndose hasta aproximadamente el 0,25 %) o polysorbate-40 a una concentración de aproximadamente 0,001 % al 1 % (prefiriéndose hasta aproximadamente el 0,5 %).

En ciertas realizaciones, una formulación de la divulgación comprende uno o más agentes estabilizadores 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, monoglicerol, o mezclas de los mismos). De forma alternativa u opcional, las formulaciones de composición inmunógena que contienen conservantes de la divulgación se pueden estabilizar además extrayendo el oxígeno de los recipientes de

almacenamiento, protegiendo la formulación de la luz (por ejemplo, usando recipientes de vidrio ámbar).

Las formulaciones de composición inmunógena que contienen conservantes de la divulgación pueden comprender uno o más transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen cualquier excipiente que por sí mismo no induzca una respuesta inmunitaria. Los excipientes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col, 2001, Vaccine, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotículas de aceite o liposomas). Dichos transportadores son bien conocidos del experto en la materia. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se detallan, por ejemplo, en Gennaro, 2000, Remington: Science y Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones de la divulgación pueden estar en forma liofilizada o acuosa, es decir, soluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas pueden administrarse de forma ventajosa directamente desde su forma envasada y, por tanto, son ideales para la inyección sin necesidad de su reconstitución en medio acuoso como sería necesario por otra parte para las composiciones liofilizadas de la divulgación.

La administración directa de las composiciones inmunógenas de la presente divulgación a un sujeto se puede llevar a cabo mediante administración parenteral (por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intravenosa o al espacio intersticial de un tejido); o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra mucosa. En una realización preferida, la administración parenteral es mediante inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o en el brazo del sujeto. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también se puede usar como alternativa la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular habitual es de 0,5 ml. Las composiciones de la divulgación se pueden preparar de diversas formas, por ejemplo, para inyección bien como soluciones líquidas o suspensiones. En ciertas realizaciones, la composición se puede preparar como un polvo o un pulverizador para la administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición se puede preparar como un supositorio o pesario o para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, en forma de pulverización, gotas, gel o polvo. Las cantidades óptimas de los componentes para una composición inmunógena particular se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de las respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

Las composiciones inmunógenas de la divulgación se pueden envasar en forma de dosis única o de multidosis (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis o más). Para formas multidosis, normalmente, aunque no necesariamente, se prefieren los viales frente a las jeringas precargadas. Los formatos multidosis adecuados incluyen aunque no de forma limitativa: 2 a 10 dosis por envase con de 0,1 a 2 ml por dosis. En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2007/127668.

Las composiciones se pueden presentar en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o se pueden presentar en dispositivos de administración precargados, por ejemplo, jeringas de componente único o múltiple, que se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa normalmente, aunque no necesariamente, contiene una dosis única de la composición inmunógena de la divulgación, aunque también se prefieren jeringuillas cargadas multidosis. Del mismo modo, un vial puede incluir una dosis única pero, como alternativa, puede incluir múltiples dosis.

Los volúmenes de dosificación eficaces se pueden establecer de forma habitual, pero una dosis típica de la composición para la inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para su administración a un sujeto humano. En ciertas realizaciones, la dosis se formular para su administración a un sujeto humano adulto, joven, adolescente, niño o bebé (es decir, que no tenga más de un año de edad) y, en realizaciones preferidas, se puede administrar mediante inyección.
Las composiciones inmunogénicas líquidas de la divulgación también son adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando se va a usar una composición inmunógena para tal reconstitución extemporánea, la divulgación proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringas ya cargadas, o uno o más de cada uno, usando el contenido de la jeringa para reconstituir el contenido del frasco antes de la inyección o viceversa.

Como alternativa, las composiciones inmunógenas de la presente divulgación se pueden liofilizar y reconstituir, por ejemplo, usando uno de una multitud de procedimientos de liofilización para criodesecación bien conocidos en la técnica para formar partículas secas de forma regular (por ejemplo, esférica), tales como microgránulos o microesferas, que tienen características de partícula tales como tamaños de diámetro promedio que se pueden seleccionar y controlar variando los procedimientos exactos utilizados para prepararlos. Las composiciones inmunógenas pueden comprender además un adyuvante que se puede preparar opcionalmente con, o contenerse en partículas secas de forma regular (por ejemplo, esférica) individuales tales como microgránulos o microesferas. En dichas realizaciones, la presente divulgación proporciona además un kit de composición inmunógena que comprende un primer componente que incluye una composición inmunógena seca, que opcionalmente comprende además uno o más conservantes de la divulgación, y un segundo componente que comprende una solución acuosa estéril para la reconstitución del primer componente. En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende uno o más conservantes, y puede comprender opcionalmente al menos un adyuvante (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/109550).

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

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

La presente divulgación también incluye procedimientos para usar las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento. Por ejemplo, una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria frente a bacterias patógenas, por ejemplo *S. pneumonia,* que comprende administrar a un sujeto una cantidad inmunógena de cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento que comprenden un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano derivado de una bacteria patógena. Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para proteger un sujeto contra una infección por *S. pneumoniae,* o un procedimiento para prevenir la infección por *S. pneumoniae,* o un procedimiento para reducir la gravedad o retrasas el inicio de al menos un síntoma asociado con una infección producida por *S. pneumoniae,* comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto una cantidad inmunógena de cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento que comprenden un antígeno bacteriano tal como un polisacárido capsular bacteriano derivado de *S. pneumoniae.* Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección, enfermedad o dolencia por estreptococos, asociada con *Streptococcus sp.* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición inmunógena descrita en el presente documento al sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento para tratar o prevenir una infección, enfermedad o dolencia por estreptococos comprende el tratamiento de seres humanos, veterinario, de animales o agrícola. Otra realización proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección, enfermedad o dolencia por estreptococos asociada con *Streptococcus sp.* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpo policlonal o monoclonal de la composición inmunógena descrita en el presente documento, y el uso de dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento de prevención de una infección por estreptococos en un sujeto que se está sometiendo a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una cantidad profilácticamente eficaz de una composición inmunógena descrita en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

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

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo sus variaciones, por ejemplo, "tratar" o "tratado") significa una o más de los siguientes: (i) la prevención de la infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la gravedad de, o en la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Así, el tratamiento se puede realizar profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección). En la presente divulgación, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con una realización particular de la presente divulgación, se proporcionan composiciones y procedimientos para tratar, incluyendo inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente, un animal hospedador contra una infección microbiana (por ejemplo, una bacteria tal como *Streptococcus).* Los procedimientos de la presente divulgación son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los procedimientos de la presente divulgación también se pueden realizar en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

Como se usa en el presente documento, "mamífero" significa un animal humano o no humano. Más concretamente, mamífero se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y de investigación, zoológico, deportes y animales de compañía tales como mascotas domésticas y otros animales domésticos incluidos, aunque no de forma limitativa, ganado bovino, ovejas, hurones, cerdos, caballos, conejos, cabras, perros, gatos y similares. Los animales de compañía preferidos son los perros y los gatos. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Una "cantidad inmunógena", y "cantidad inmunológicamente eficaz", ambos de los cuales se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a la cantidad de antígeno o de composición inmunógena suficiente como para generar una respuesta inmunitaria, bien una respuesta celular (linfocitos T) o humoral (linfocitos B o anticuerpos), o ambas, tal como se mide en ensayos convencionales conocidos para un experto en la materia.

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

S. pneumoniae "enfermedad invasiva" es el aislamiento de una bacteria de un sitio normalmente estéril, donde hay asociados signos/síntomas clínicos de la enfermedad. Los sitios corporales normalmente estériles incluyen la sangre, LCR, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido articular/sinovial, hueso, sitios corporales internos (nódulos linfáticos, cerebro, corazón, hígado, bazo, humor vítreo, riñón, páncreas, ovario) u otros sitios normalmente estériles. Las dolencias clínicas que caracterizan las enfermedades invasivas incluyen bacteremia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, choque séptico y más.

La eficacia de un antígeno como inmunógeno, se puede medir bien mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, 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 linfocitos B midiendo los niveles de anticuerpos en circulación específicos del antígeno en el suero. También se puede detectar una respuesta inmunitaria midiendo los niveles séricos de anticuerpos específicos de antígeno inducidos tras la administración del antígeno, y más específicamente, midiendo la capacidad de los anticuerpos inducidos de este modo para mejorar la capacidad opsonofagocítica de determinados glóbulos blancos, como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria se puede medir exponiendo al hospedador inmunizado con el antígeno que se ha administrado. Por ejemplo, si el antígeno para el que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección inducido por la cantidad inmunógena del antígeno se mide por la detección del porcentaje de supervivencia o del porcentaje de mortalidad tras la exposición de los animales a las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección se puede medir midiendo al menos un síntoma asociado con la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada con la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna multiantígeno o multicomponente o composiciones inmunógenas variarán con respecto a cada uno de los otros componentes y se puede determinar mediante los procedimientos conocidos por el experto en la materia. Dichos procedimientos incluirían procedimientos para medir la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" significa en un 20 %, preferentemente comprendido en un 10 %, y más preferentemente comprendido en un 5 % de un valor o intervalo dado.

La divulgación proporciona además anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen de manera específica y selectiva a los polisacáridos capsulares o glucoconjugados de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los anticuerpos se generan tras la administración a un sujeto de los polisacáridos capsulares o de los glucoconjugados de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos purificados o aislados dirigidos frente a uno o más de los polisacáridos capsulares o glucoconjugados de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación son funcionales tal como se mide mediante la eliminación de bacterias en un modelo de eficacia animal o a través de un ensayo de eliminación opsonofagocítica. En algunas

realizaciones, los anticuerpos de la divulgación confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente divulgación proporciona moléculas de polinucleótidos que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la divulgación, y una célula, línea de células (tales como células de hibridoma u otras líneas celulares genomanipuladas para la producción recombinante de anticuerpos) o un animal transgénico que produce un anticuerpo o composición de anticuerpos de la divulgación, usando técnicas bien conocidas de los expertos en la materia.

Los anticuerpos o las composiciones de anticuerpos de la divulgación se pueden usar en un procedimiento de tratamiento o de prevención de una infección, enfermedad o dolencia por estreptococos asociada a *Streptococcus sp.* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpo policlonal o monoclonal, y el uso de dicho anticuerpo o preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la divulgación también pueden ser útiles para procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, la detección de la presencia o cuantificación de los niveles de polisacárido capsular o un glucoconjugado del mismo.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración y no como limitación. Abreviaturas: PM = peso molecular; WFI = agua para inyección; TEMPO = radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi; NCS = N-clorosuccinimida.

Ejemplos

Ejemplo 1: Conjugación de Pn serotipo 12F usando TEMPO/NCS

Para mejorar la estabilidad de los glucoconjugados Serotipo 12F-CRM_{197}, se exploraron químicas usando el radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como oxidante auxiliar para oxidar alcoholes primarios a grupos aldehído. El análisis CG/EM mostraron que los sitios de oxidación eran diferentes de los de la oxidación mediada por peryodato. En el caso de la oxidación con TEMPO-NCS, se oxidaron α-D-Glcp y 2-Glcp, mientras que α-D-Galp fue el sitio de oxidación principal que utilizó el peryodato (véase la Figura 1). Como se describe con más detalle en el presente documento, TEMPO se utilizó en cantidades catalíticas (≤ 0,1 equivalentes molares) y se alcanzó el grado de oxidación deseado (DO) al variar las cantidades de NCS utilizadas. Posteriormente, se sintetizaron y se caracterizaron varios conjugados. Por lo general, la producción de glucoconjugados de Serotipo 12F se llevó a cabo en varias fases, de la siguiente manera:

1) Hidrólisis del polisacárido Serotipo 12 a pesos moleculares de 50 a 500 kDa.
2) Activación del polisacárido Serotipo 12F con TEMPO/NCS
3) Purificación del polisacárido activado
4) Conjugación del Serotipo 12F activado a la proteína to CRM_{197}
5) Purificación de los conjugados 12F - CRM.

Ejemplo 2: Hidrólisis y oxidación del polisacárido Serotipo 12F

La hidrólisis de los polisacáridos se realizó típicamente en condiciones ácidas con calentamiento para obtener un peso molecular promedio en peso en el intervalo deseado de 100 a 350 kDa. Se describe a continuación un ejemplo típico.

Hidrólisis

La solución de polisacárido Serotipo 12F se añadió a una recipiente de reacción encamisado. A esto, se añadió el volumen necesario de ácido acético 0,30 M y agua para inyección (WFI) para mantener una concentración de ácido acético ~ 0,1 M. El pH de la solución se ajustó a 3,2 ± 0,3 usando NaOH 1 N o ácido acético glacial. La temperatura de la mezcla de reacción se aumentó hasta 70 ± 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a 70 ± 5 °C durante 90-120 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta 23 ± 2 °C y se neutralizó (pH 7,0) por adición de NaOH 1 M. El polisacárido hidrolizado se purificó mediante ultrafiltración/diafiltración contra WFI usando membranas MWCO de 30K. La disolución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó de 2 a 8 °C hasta oxidación. El peso molecular del polisacárido hidrolizado se analizó mediante SEC-MALLS para garantizar que el peso molecular está comprendido en el intervalo diana de 100 a 350 kDa.

Oxidación parcial

En un experimento, el polisacárido Serotipo 12F se dimensionó mecánicamente usando homogeneización con presión mediante un microfluidizador para reducir el peso molecular hasta aproximadamente 100 a 500 kDa. El polisacárido dimensionado se añadió a un recipiente de reacción a una concentración de 4,0 mg/ml y se mezcló con tampón bicarbonato/carbonato (tampón de $NaHCO_3$ 0,5 M/Na_2CO_3 0,05 M, pH 8,6) en una proporción de 1:1 v/v. A la mezcla agitada se añadieron ≤ 0,1 equivalentes molares de TEMPO. La reacción se inició mediante la adición de 0,6 a 1,0 equivalentes molares de (NCS). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual el polisacárido activado se purificó mediante diafiltración, con WFI usando una membrana de ultrafiltración de 30K. Se recogió el polisacárido purificado y se determinó el grado de oxidación (GO) mediante mediciones cuantitativas de aldehído (usando un ensayo de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH)) y polisacárido (usando un ensayo de antrona).

En otro experimento, el polisacárido Serotipo 12F se hidrolizó para reducir el peso molecular hasta un peso molecular

de aproximadamente 100 a 500 kDa. El polisacárido Serotipo 12F se añadió a un recipiente de reacción y se mezcló con un tampón de $NaHCO_3$ 0,5 M/Na_2CO_3 0,05 M (pH 8,6) en una relación de 1:1 v/v. A la mezcla agitada se añadieron de 0,6 a 1,0 equivalentes molares de (NCS) disuelta en WFI. La activación se inició mediante la adición de aproximadamente 0,1 equivalentes molares de TEMPO disuelto en WFI. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual el polisacárido activado se purificó mediante diafiltración con WFI usando una membrana de ultrafiltración de 30K. El polisacárido activado purificado se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a 4 °C antes de su uso.

Las oxidaciones mediadas por TEMPO/NCS también se realizaron correctamente en tampones de fosfato de sodio de pH 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0. En algunos experimentos de activación se usó un alcohol primario tal como n-propanol para inactivar los reactivos para evitar la sobreoxidación del sacárido. En otro conjunto de experimentos, el polisacárido químicamente hidrolizado se sometió directamente a oxidación, sin la etapa de purificación mediante ultrafiltración/diafiltración.

Ejemplo 3: Conjugación del polisacárido Serotipo 12F oxidado

En un experimento, el polisacárido Serotipo 12F purificado oxidado se añadió a un recipiente de reacción seguido por la adición de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (pH 6,5) hasta una concentración final de tampón de 0,1 M. A esta solución, se añadió CRM_{197} previamente liofilizado y se mezcló completamente para obtener una solución homogénea. El pH se ajustó a 6,8 usando una solución de HCl diluida o una solución de NaOH 1 N. A esto le siguió la adición de 1,5 equivalentes molares de $NaCNBH_3$. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente (23 °C) y durante 2,5 días a 37 °C. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con 1X solución salina al 0,9 % y los grupos aldehído sin reaccionar se "protegieron" con 2 equivalentes molares de borohidruro de sodio. El tiempo de la reacción de protección fue de 3 horas.

En otro experimento, el polisacárido Serotipo 12F purificado activado se añadió a un recipiente de reacción seguido por la adición de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (a pH 6,5) hasta una concentración final de tampón de 0,1 M. A esta solución, se añadió CRM_{197} previamente liofilizado y se mezcló completamente para obtener una solución homogénea. El pH se ajustó a 6,8 usando una solución de HCl diluida o una solución de NaOH 1 N. A esto le siguió la adición de 3 equivalentes molares de $NaCNBH_3$. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente (23 °C) y durante 48 h a 37 °C. La mezcla de reacción se diluyó a continuación con 1X solución salina al 0,9 % y, con agitación, los grupos aldehído sin reaccionar se "protegieron" con 1 equivalentes molar de borohidruro de sodio $NaBH_4$. El tiempo de la reacción de protección fue de 3 horas.

En otro experimento, el polisacárido Serotipo 12F purificado activado se añadió a un recipiente de reacción y se mezcló con solución de CRM_{197}. La mezcla se liofilizó y el polvo se disolvió en un tampón fosfato, de sodio 0,1 M (pH 6,8) hasta una concentración final de sacárido de 5 mg/ml. En caso necesario, el pH se ajustó a 6,8 usando una solución de HCl diluida o una solución de NaOH 1 N. A esto le siguió la adición de 3 equivalentes molares de $NaCNBH_3$. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente (23 °C) y durante 48 h a 37 °C. La mezcla de reacción se diluyó a continuación con 1X solución salina al 0,9 %, los grupos aldehído sin reaccionar se "protegieron" con 1 equivalentes molar de borohidruro de sodio $NaBH_4$. El tiempo de la reacción de protección fue de 3 horas.

Ejemplo 4: Purificación del conjugado

La mezcla de reacción protegida se filtró con un filtro de 5 µm y después se purificó usando membranas de ultrafiltración MWCO de 100K. El conjugado se diafiltró primero usando succinato 10 mM/solución salina al 0,9 %, tampón pH 6,0. El conjugado purificado se filtró después a través de filtros de 0,45/0,22 µm para obtener el conjugado en masa.

Ejemplo 5: Grado de oxidación

La oxidación correcta de los alcoholes primarios del polisacárido Serotipo 12F se consiguió con el sistema TEMPO/NCS. Los polisacáridos Serotipo 12F hidrolizados se oxidaron con diferentes niveles de grados de oxidación (DO) por ajuste de las cantidades del oxidante auxiliar NCS. El efecto de las cantidades variables de NCS sobre el DO usando diferentes lotes de polisacáridos y de pesos moleculares se muestra en la Figura 2. Típicamente, se usaron 0,5 - 2,5 equivalentes molares de NCS para lograr el grado de oxidación diana. Típicamente, la reacción de oxidación se completa en 2 horas, puesto que no se observaron cambios significativos en el DO después de 2 horas.

Se generaron varios conjugados de Serotipo 12F que se caracterizaron usando el polisacárido oxidado TEMPO/NCS. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Algunos conjugados representativos también se generaron correctamente utilizando otros serotipos de neumococos activados con el sistema TEMPO/NCS. El procedimiento para la generación de conjugados para otros serotipos de neumococos fue el mismo que el procedimiento utilizado para el Serotipo 12F. Los resultados se describen en las Tablas 2 a 4.

Tabla 1: Conjugados de neumococo Serotipo 12F-CRM_{197}

Lote del conjugado	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
Tiempo de oxidación (h)	**2**	**2**	**4**	**2**	**2**	**2**
Grado de oxidación (D.O)	**12,0**	**6,0**	**9,6**	**12,0**	**11,5**	**11,5**
Producción de sacárido activado, %	**80**	**71**	**70**	**89**	**86**	**86**
PM del sacárido activado por MALLS (kDa)	**137**	**155**	**170**	**190**	**240**	**240**
Procedimiento de conjugación	**Lyo-CRM**	**Lyo-CRM**	**Lyo-CRM**	**Lyo-CRM**	**Lyo-CRM**	**Co-Lyo**
Resultados del conjugado						
Producción de sacáridos (%)	**51,6**	**76,8**	**53,6**	**76,3**	**65,8**	**40,7**
Proporción de sacárido/proteína	**1,2**	**0,9**	**1,0**	**1,1**	**1,4**	**0,9**
% de sacárido libre	**24**	**10**	**17**	**20**	**23**	**14**
PM por SEC-MALLS (kDa)	**2050**	**3000**	**3600**	**1500**	**2400**	**2100**

Tabla 2: Conjugados de neumococo Serotipo 3-CRM_{197}

Lote del conjugado	Pn3-106-1	Pn3-106-4
Polisacárido MALLS (Mw) kDa	430	430
Oxidación		
Tiempo de oxidación (h)	2	2
D.O.	9,4	15
Producción de sacárido activado, %	55	65
PM del sacárido activado por SEC-MALLS (kDa)	340	360
Conjugación		
Resultados del conjugado		
Producción de sacáridos (%)	29,9	55,0
Proporción de sacárido/proteína	0,7	1,6
% de sacárido libre	21,0	30,0
PM por SEC-MALLS (kDa)	2100	2600

Tabla 3: Conjugados de neumococo Serotipo 33F-CRM_{197}

Lote del conjugado	33F-#55	33F-#63
Polisacárido MALLS (PM)	128 kDa	150 kDa
D.O.	20	5
Producción	92 %	97 %
Producción de sacáridos (%)	44 %	68 %
Proporción de sacárido/proteína	0,54	0,68
Sacárido libre	<1 %	1,10 %
Proteína libre	<1 %	<1 %
PM por SEC-MALLS (kDa)	11160 kDa	2730 kDa

Tabla 4: Conjugados de neumococo Serotipo 10A

Lote del conjugado	10A-#77	10A-#78	10A-#85	10A-#88	10A-#89	10A-#103	10A-#104
Polisacárido MALLS (PM)	538 kDa	538 kDa	538 kDa	538 kDa	538 kDa	509 kDa	509 kDa
D.O.	7,9	24	12	6,9	10	11,3	5,7
Producción	82 %	90 %	94 %	88 %	94 %	94 %	86 %
Producción de sacáridos (%)	35	20	42	35	41	43	36
Proporción de sacárido/proteína	0,53	0,33	0,73	0,7	0,95	0,6	0,45
Sacárido libre	<1	20	4,6	1,6	5,7	<1	<1
Proteína libre	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %
Pm por SEC-MALLS	3168	16390	4117	3137	2855	4380	3772

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de conjugados de Pn-serotipo 12F-CRM197 usando el procedimiento de oxidación TEMPO/NCS

Los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados de Serotipo 12F-CRM_{197} en ratones se determinaron en condiciones estándar. En la Tabla 5 se muestran los títulos de OPA (título de media geométrica (GMT) con intervalo de confianza del 95 % (CI)) a las cuatro y siete semanas, lo que demuestra que el conjugado de serotipo 12F-CRM_{197} (Lote 12F-97B; véase también la Tabla 1 para los datos de caracterización de este conjugado) desencadenan títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad en murino. El conjugado generado por TEMPO-NCS fue más inmunógeno que el conjugado del control (171B) generado a partir de la oxidación con peryodato.

Tabla 5: Inmunogenicidad de los conjugados de Serotipo 12F-CRM197

Muestra/dosis del conjugado	0,001 ug	0,01 ug	0,1 ug
Control de oxidación con peryodato (171B)	4	16	172
Oxidación con TEMPO/NCS (12F-97B)	40	417	880

Ejemplo *7*: Posible mecanismo para el conjugado Pn-serotipo 12F usando el radical nitroxilo en presencia de un oxidante tal como TEMPO/NCS

El posible mecanismo de oxidación/conjugación de Pn-serotipo 12F se muestran en la Figura 6. Los grupos hidroxilo primarios del polisacárido se oxidan por cantidades catalíticas de radical nitroxilo tal como TEMPO, con un oxidante tal como NCS como oxidante estequiométrico. El oxidante real es la sal de N-oxoamonio, en un ciclo catalítico. La oxidación de los grupos hidroxilo C-6 primarios genera grupos aldehído que posteriormente se hacen reaccionar con los grupos amino primarios de la lisina de la proteína transportadora (CRM197) para generar el glucoconjugado.

Ejemplo 8: Comparación de estabilidad

La comparación de la estabilidad (a 25 °C) de los conjugados generados mediante la oxidación del peryodato vs la oxidación con TEMPO/NCS (véase la Figura 7) demostró que el conjugado generado por la oxidación de los polisacáridos de Pn-12F era relativamente más estable. Como se muestra en la Figura 7, un aumento de sacárido libre con el tiempo se observó para el glucoconjugado generado mediante la oxidación con peróxido del polisacárido de Pn-12F a 25 °C. Por el contrario, el glucoconjugado preparado usando la oxidación con TEMPO/NCS del polisacárido de Pn-12F no mostró tendencias significativas para el sacárido libre en condiciones similares.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína transportadora, que comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar un sacárido, en el que dicho sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un disolvente acuoso para producir un sacárido activado; y
b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sacárido se hace reaccionar con de 0,1 a 10 equivalentes molares de N-clorosuccinimida.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sacárido se hace reaccionar con de 0,5 a 1,5 equivalentes molares de N-clorosuccinimida.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) está presente en una cantidad catalítica.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sacárido se hace reaccionar con menos de aproximadamente 0,3 equivalentes molares de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO).

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grado de oxidación del sacárido activado varía de 3 a 40.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grado de oxidación del sacárido activado varía de 6 a 14.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polisacárido capsular se deriva de *S. pneumoniae*.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el polisacárido capsular se selecciona entre los polisacáridos capsulares de Pn-serotipo 3, Pn-serotipo 10A, Pn-serotipo 12F, y Pn-serotipo 33F.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polisacárido capsular se deriva de *N. meningitidis.*

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el polisacárido capsular se selecciona entre los polisacáridos capsulares (Mn)-serotipo A, C, W135 e Y meningocócicos.

12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el polisacárido capsular es el polisacárido capsular (Mn)-serotipo X.

13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la proteína transportadora es una toxina derivada del tétanos, difteria, pertussis, *Pseudomonas, E. coli, Staphylococcus* o *Streptococcus.*

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la proteína transportadora es CRM_{197}.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que antes de la etapa a), el sacárido se dimensiona.

16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que antes de la etapa a), el sacárido se hidroliza o se dimensiona mecánicamente.

17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que antes de la etapa a), el sacárido se hidroliza o se dimensiona mecánicamente mediante homogeneización a presión para conseguir un peso molecular de 50 kDa a 500 kDa.

18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que antes de la etapa a), el sacárido se hidroliza hasta un peso molecular comprendido de 100 a 400 kDa.

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que antes de la etapa a), el sacárido se hidroliza hasta un peso molecular comprendido de 150 a 350 kDa.

FIGURA 1

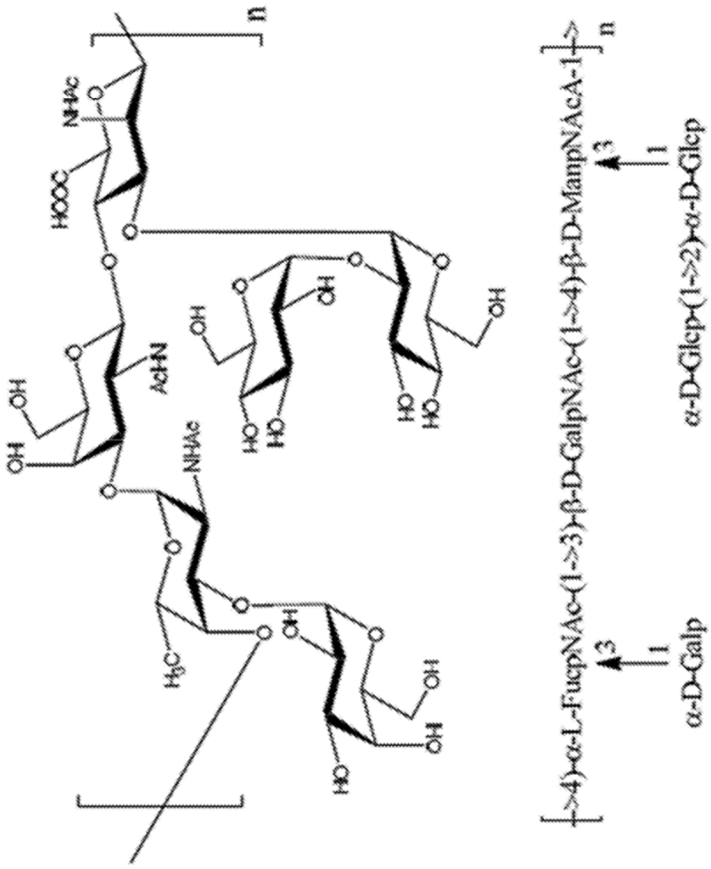

α-D-Galp
α-D-Glcp-(1->2)-α-D-Glcp
-->4)-α-L-FucpNAc-(1->3)-β-D-GalpNAc-(1->4)-β-D-ManpNAcA-1->

FIGURA 2

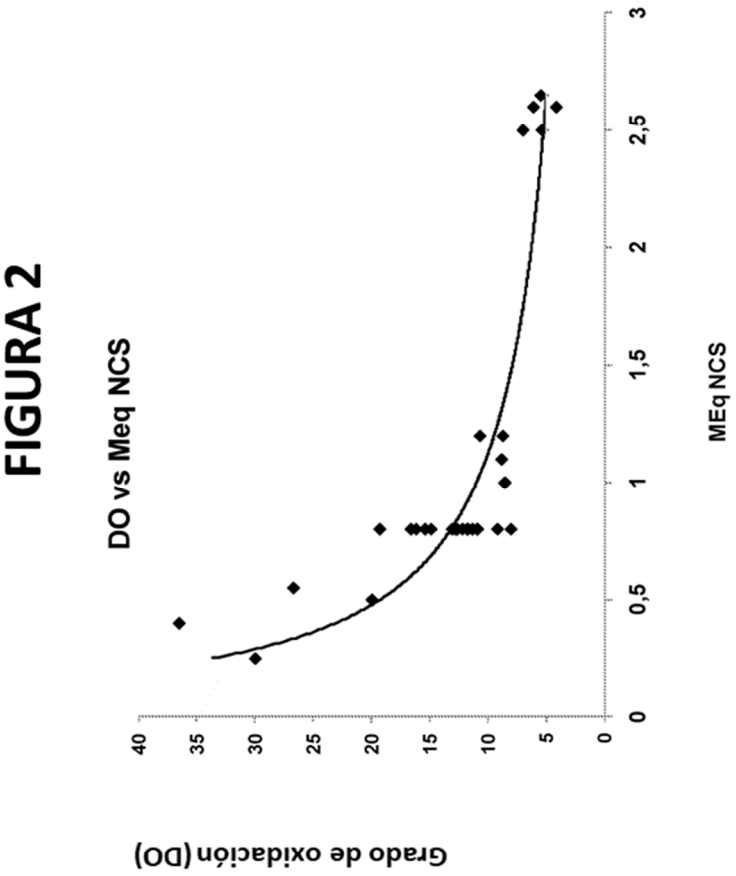

DO vs Meq NCS
Grado de oxidación (DO)
MEq NCS
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3

FIGURA 3

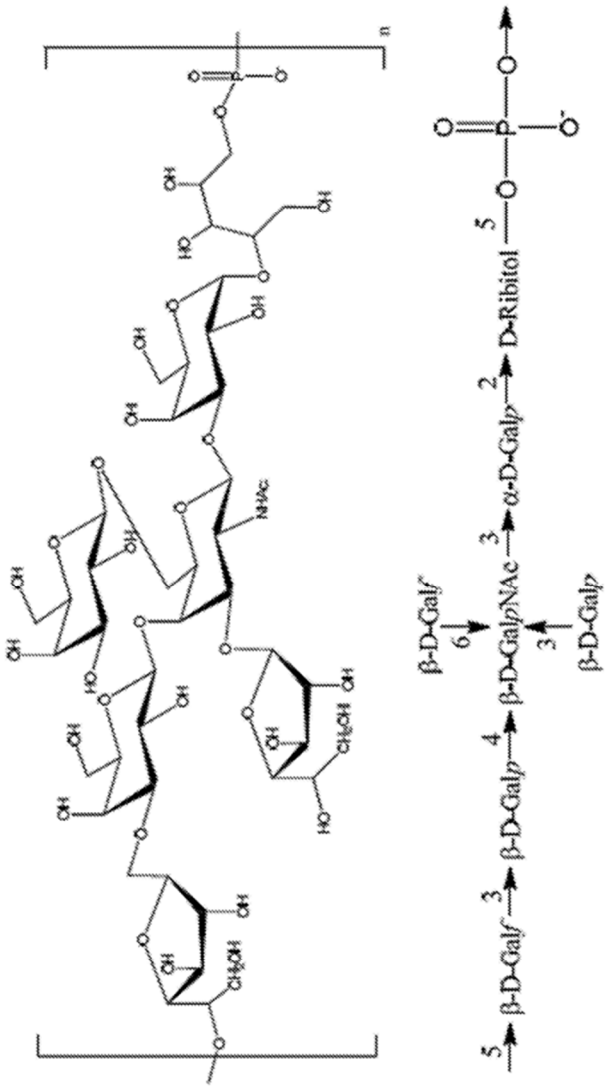

β-D-Galf
6
5
β-D-Galf
3
β-D-Galp
4
β-D-GalpNAc
3
α-D-Galp
2
D-Ribitol
5
3
β-D-Galp

FIGURA 4

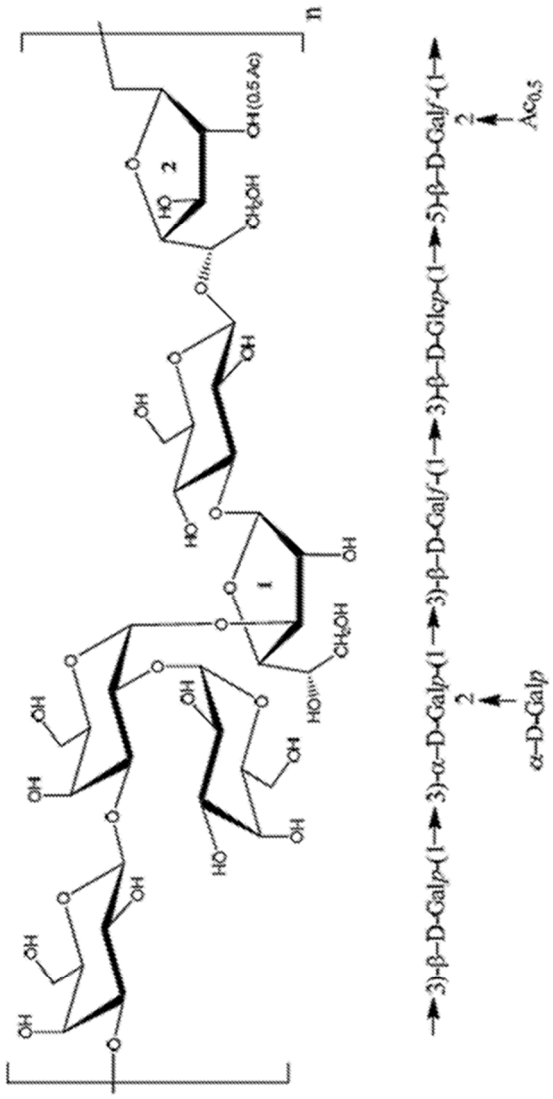
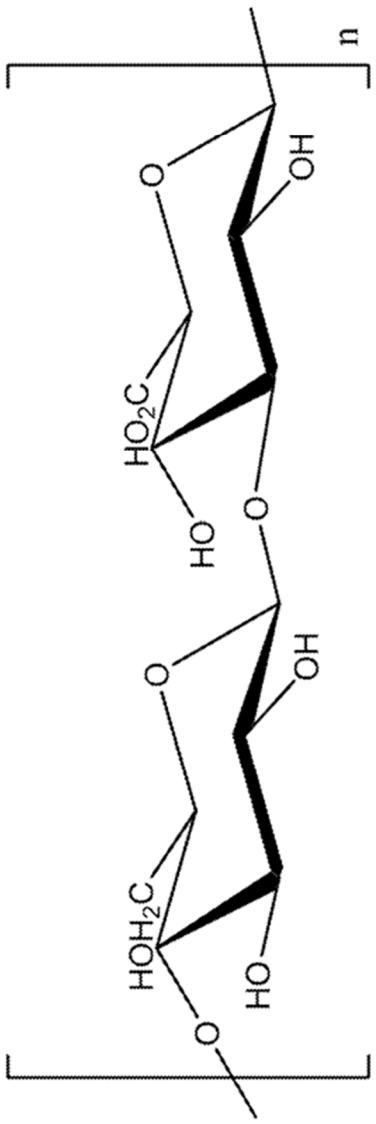

→3)-β-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Galf-(1→3)-β-D-Glcp-(1→5)-β-D-Galf-(1→
2
α-D-Galp
2
Ac0,5

FIGURA 5



→ 4)-β-D-Glcp-(1→ 3)-β-GlcpA-(1 →

FIGURA 6

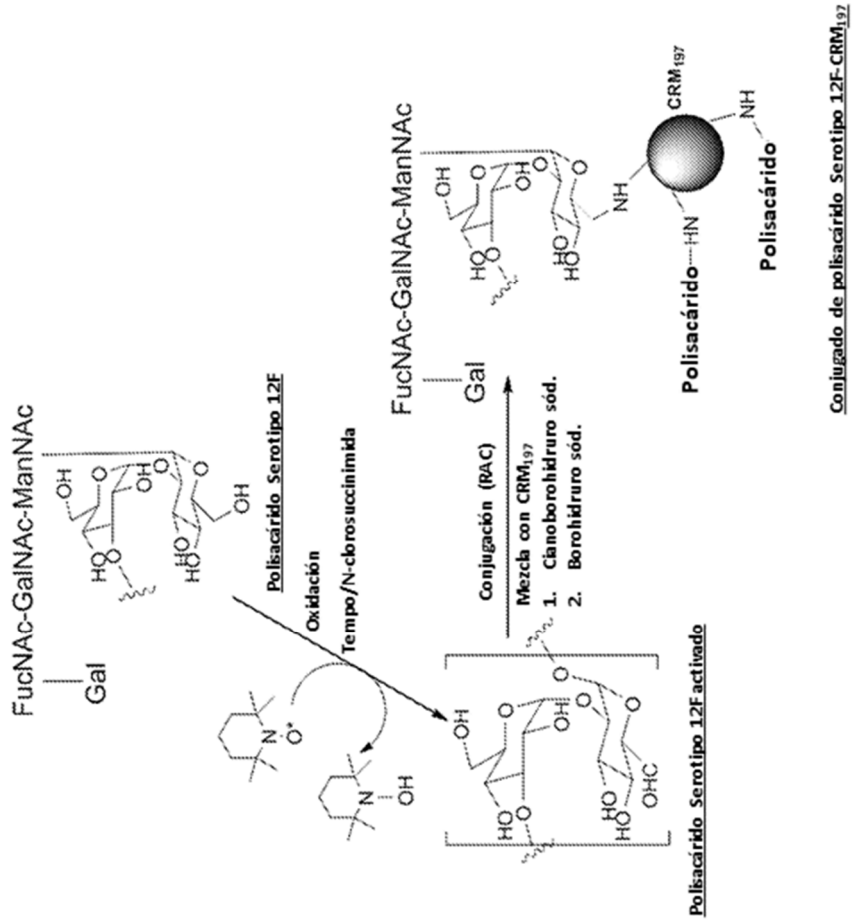
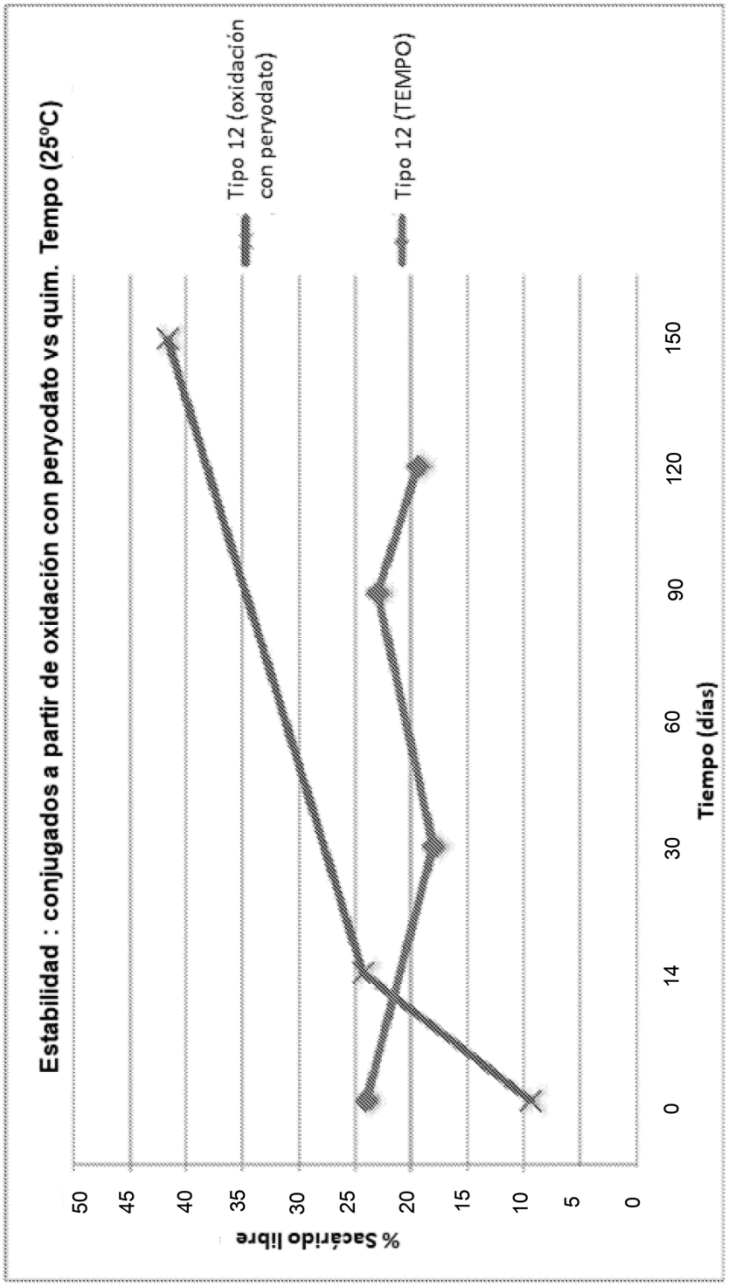

FucNAc-GalNAc-ManNAc
Gal
Polisacárido Serotipo 12F
Oxidación
Tempo/N-clorosuccinimida
Polisacárido Serotipo 12Factivado
Conjugación (RAC)
Mezcla con CRM197
1. Cianoborohidruro sód.
2. Borohidruro sód.
FucNAc-GalNAc-ManNAc
Gal
CRM197
Polisacárido
Polisacárido
Conjugado de polisacárido Serotipo 12F-CRM197

FIGURA 7


Estabilidad : conjugados a partir de oxidación con peryodato vs quim. Tempo (25ºC)
Tipo 12 (oxidación con peryodato)
Tipo 12 (TEMPO)
% Sacárido libre
Tiempo (días)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
14
30
60
90
120
150