(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 800 479**

(51) Int. CI.:

A61K 47/64 (2007.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2013 E 18183661 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3421051**

(54) Título: **Procedimientos y composiciones de glucoconjugación**

(30) Prioridad:

16.08.2012 US 201261684043 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

GU, JIANXIN;
KIM, JIN-HWAN;
PRASAD, KRISHNA A. y
YANG, YU-YING

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

Procedimientos y composiciones de glucoconjugación

Campo de la invención

La invención se refiere en general a glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora a través de un espaciador de (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC), a composiciones inmunogénicas que comprenden tales glucoconjugados y a procedimientos para la preparación y uso de tales glucoconjugados y composiciones inmunogénicas.

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción de los procedimientos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y cualquier referencia en la descripción de los procedimientos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en cualquiera de estos procedimientos.

Antecedentes de la invención

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

El documento WO 2008/157590 desvela procedimientos para fabricar glucoconjugados inmunogénicos. El documento WO 2007/071707 desvela vacunas de *Streptococcus pneumoniae* que comprenden sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con proteínas transportadoras. Los conjugados se han generado con éxito utilizando varios reactivos de reticulación o acoplamiento, tales como reticuladores homobifuncionales, heterobifuncionales o de longitud cero. Actualmente existen disponibles muchos procedimientos para el acoplamiento de moléculas inmunogénicas, tales como sacáridos, proteínas y péptidos, a transportadores de péptidos o proteínas. La mayoría de los procedimientos crean enlaces amina, amida, uretano, isotiourea o disulfuro, o, en algunos casos, tioéteres. Una desventaja del uso de reactivos de reticulación o acoplamiento que introducen sitios reactivos en las cadenas laterales de moléculas de aminoácidos reactivos en las moléculas transportadoras y/o inmunogénicas es que los sitios reactivos, si no se neutralizan, son libres de reaccionar con cualquier molécula no deseada ya sea *in vitro* (afectando así adversamente la funcionalidad o estabilidad de los conjugados) o *in vivo* (presentando así un riesgo potencial de acontecimientos adversos en personas o animales inmunizados con las preparaciones). Dichos sitios reactivos en exceso pueden hacerse reaccionar o "protegerse", para inactivar estos sitios, utilizando diversas reacciones químicas conocidas, pero estas reacciones pueden, de otro modo, ser perjudiciales para la funcionalidad de los conjugados. Esto puede ser particularmente problemático cuando se intenta crear un conjugado introduciendo los sitios reactivos en la molécula transportadora, ya que su tamaño más grande y su estructura más compleja (en relación con la molécula inmunogénica) puede hacerla más vulnerable a los efectos perturbadores del tratamiento químico. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de nuevos procedimientos para preparar conjugados de proteínas transportadoras protegidas adecuadamente, de modo que la funcionalidad del transportador se conserva y el conjugado conserva la capacidad de provocar la respuesta inmunológica deseada.

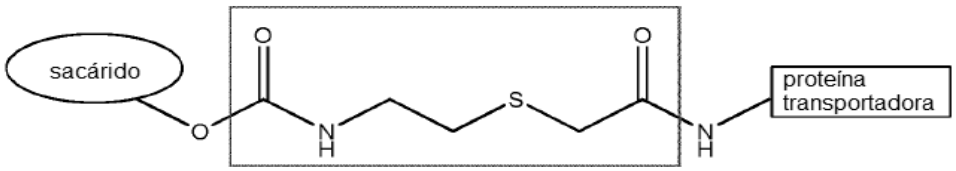
Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere a procedimientos para preparar glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora a través de un enlazador bivalente heterobifuncional denominado en el presente documento como un espaciador de (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC). El espaciador eTEC incluye siete átomos lineales (es decir, -C(O)NH$(CH_2)_2$SCH_2C(O)-) y proporciona enlaces tioéter y amida estables entre el sacárido y la proteína transportadora. La invención proporciona glucoconjugados unidos a eTEC, las composiciones inmunogénicas que los comprenden y los procedimientos para su uso de tales glucoconjugados y composiciones inmunogénicas.

En un aspecto, la invención proporciona un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC, en el que el sacárido está unido covalentemente al espaciador eTEC a través de un enlace carbamato, y en el que la proteína transportadora está unida covalentemente al espaciador eTEC a través de un enlace amida.

En algunas realizaciones, el sacárido es un polisacárido, tal como un polisacárido capsular derivado de bacterias, en particular de bacterias patogénicas. En otras realizaciones, el sacárido es un oligosacárido o un monosacárido.

Los glucoconjugados unidos a eTEC de la invención pueden representarse mediante la fórmula general (I):



(I),

en la que los átomos que comprenden el espaciador eTEC están contenidos en el recuadro central.

Las proteínas transportadoras incorporadas en los glucoconjugados de la invención se seleccionan del grupo de proteínas transportadoras generalmente adecuadas para tales fines, como se describe adicionalmente en el presente documento o conocido por los expertos en la técnica. En realizaciones particulares, la proteína transportadora es CRM_{197}.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar un glucoconjugado que comprende un sacárido conjugado con una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un derivado de ácido carbónico en un disolvente orgánico para producir un sacárido activado; b) hacer reaccionar el sacárido activado con cistamina o cisteamina o una sal del mismo, para producir un sacárido tiolado; c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente reductor para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres; d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína transportadora activada que comprende uno o más grupos α-haloacetamida, para producir un conjugado de proteína transportadora-sacárido tiolado; y e) hacer reaccionar el conjugado de proteína transportadora-sacárido tiolado con (i) un primer reactivo de protección capaz de proteger los grupos α-haloacetamida no conjugados de la proteína transportadora activada; y/o (ii) un segundo reactivo de protección capaz de proteger los restos de sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado; por lo que se produce un glucoconjugado eTEC unido.

En casos frecuentes, el derivado de ácido carbónico es 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI). Preferentemente, el derivado de ácido carbónico es CDT y el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, tal como dimetilsulfóxido (DMSO). En casos preferidos, el sacárido tiolado se produce mediante reacción del sacárido activado con el reactivo de tioalquilamina simétrico bifuncional, cistamina o una sal del mismo. Como alternativa, el sacárido tiolado se puede formar mediante reacción del sacárido activado con cisteamina o una sal del mismo. Los glucoconjugados unidos a eTEC producidos por los procedimientos de la divulgación pueden representarse mediante la fórmula general (I).

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

En algunos casos, la etapa de protección e) comprende además la reacción con un agente reductor, por ejemplo, DTT, TCEP o mercaptoetanol, después de la reacción con el primero y/o segundo reactivo de protección.

En algunos casos, la etapa d) comprende además proporcionar una proteína transportadora activada que comprende uno o más grupos de α-haloacetamida antes de hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con la proteína transportadora activada. En casos frecuentes, la proteína transportadora activada comprende uno o más grupos α-bromoacetamida.

En otro aspecto, la invención proporciona un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un sacárido conjugado con una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC producido de acuerdo con cualquiera de los procedimientos desvelados en el presente documento.

Para cada uno de los aspectos de la divulgación, en realizaciones particulares de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento, el glucoconjugado unido a eTEC comprende un sacárido que es un polisacárido capsular bacteriano, en particular un polisacárido capsular derivado de bacterias patógenas.

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

En ciertas de dichas realizaciones, el glucoconjugado unido a eTEC comprende un polisacárido capsular

meningocócico (Mn) derivado de *Neisseria meningitidis*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y.

En realizaciones particularmente preferidas, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular Pn o Mn, conjugado covalentemente a CRM_{197} a través de un espaciador eTEC.

Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento son útiles en diversas aplicaciones. Por ejemplo, los glucoconjugados de la invención se pueden usar en la producción de composiciones inmunogénicas que comprenden un glucoconjugado unido a eTEC. Dichas composiciones inmunogénicas pueden usarse para proteger a los receptores de infecciones bacterianas, por ejemplo, por bacterias patógenas tales como *S. pneumonia o N. meningitidis*.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. en la que el glucoconjugado comprende un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC, tal como se describe en el presente documento.

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

En algunas de dichas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular de Pn derivado de *S. pneumoniae*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

En ciertas de dichas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular Mn derivado de *N. meningitidis*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y.

En realizaciones preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular Pn o Mn, conjugado covalentemente a CRM_{197} a través de un espaciador eTEC.

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

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la invención, en la que dicha composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano.

En un caso, la infección, enfermedad o afección está asociada con la bacteria *S. pneumonia* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular Pn. En otro caso, la infección, enfermedad o afección está asociada con la bacteria *N. meningitidis* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular Mn.

En otros aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra bacterias patógenas; un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección causada por bacterias patógenas; y un procedimiento para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una infección, enfermedad o afección causada por bacterias patógenas, en cada caso, administrando a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el glucoconjugado comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano derivado de las bacterias patógenas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el glucoconjugado comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano. En casos preferidos, el procedimiento consiste en producir una respuesta inmunológica protectora en el sujeto, como se describe adicionalmente en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para administrar una composición inmunogénica inmunológicamente eficaz que comprende un glucoconjugado unido a eTEC a un sujeto para generar una respuesta inmunológica protectora en el sujeto, como se describe adicionalmente en el presente documento.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo generado en respuesta a un glucoconjugado unido a eTEC de la presente invención, o una composición inmunogénica que comprende tal glucoconjugado. Dichos anticuerpos pueden usarse en investigaciones y ensayos de laboratorio clínico, tal como la detección bacteriana y el serotipado, o pueden usarse para conferir inmunidad pasiva a un sujeto.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC de la presente invención, para su uso en la prevención, tratamiento o mejora de la infección bacteriana, por ejemplo, infección por *S. pneumonia* o *N. meningitidis.*

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC de la presente invención, para la preparación de un medicamento para la prevención, tratamiento o mejora de la infección bacteriana, por ejemplo, infección por *S. pneumonia* o *N. meningitidis.*

En ciertos casos preferidos de los procedimientos y usos terapéuticos y/o profilácticos descritos anteriormente, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular bacteriano unido covalentemente a una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC. En casos frecuentes de los procedimientos y usos descritos en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular Pn o un polisacárido capsular Mn. En algunas de dichos casos, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En ciertas de dichos casos, el polisacárido capsular Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y.

En determinadas realizaciones preferidas, la proteína transportadora es CRM_{197}. En realizaciones particularmente preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular Pn o Mn, conjugado covalentemente a CRM_{197} a través de un espaciador eTEC.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra un esquema general para la preparación de glucoconjugados unidos a eTEC de la invención, para un glucoconjugado que comprende un polisacárido conjugado covalentemente a CRM_{197}.

La **Figura 2** muestra una estructura de polisacáridos repetitiva de *S. pneumoniae* polisacárido capsular de serotipo 33F (Pn-33F).

La **Figura 3** muestra una estructura de polisacáridos repetitiva de *S. pneumoniae* polisacárido capsular de serotipo 22F (Pn-22F).

La **Figura 4** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 10A (Pn-10A).

La **Figura 5** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 11A (Pn-11A).

La **Figura 6** muestra una estructura representativa de un glucoconjugado de Pn-33F que incorpora el enlazador eTEC (A) y los potenciales sitios de sulfhidrilo libres (B) libres y protegidos.

La **Figura 7** muestra un diagrama de flujo del procedimiento representativo para los procedimientos de activación (A) y conjugación (B) utilizados en la preparación del glucoconjugado Pn-33F para CRM_{197}.

La **Figura 8** muestra un nivel de tiolación de polisacárido capsular Pn-33F en función de los equivalentes molares de CDT utilizados en la etapa de activación.

Descripción detallada

La presente invención se puede entender más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas de la invención y los ejemplos incluidos en el presente documento. Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la invención pertenece entiende habitualmente. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o la prueba de la presente invención cualquier procedimiento y materiales similares a los descritos en el presente documento, ciertos procedimientos y materiales preferidos se describen en el presente documento. Al describir las realizaciones y reivindicar la invención, se utilizará cierta terminología de acuerdo con las definiciones establecidas a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y las referencias a "un espaciador eTEC" se refieren a uno o más espaciadores eTEC, como será evidente para un experto en la técnica al leer la divulgación.

Tal 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, periodo de tiempo, peso molecular, temperatura o pH. Tal intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, normalmente dentro del 20 %, más típicamente dentro del 10 % e incluso más típicamente dentro del 5 % del valor o intervalo indicado. Algunas veces, dicho intervalo puede estar dentro del error experimental típico de los procedimientos estándar utilizados para la medición y/o determinación de un valor o intervalo determinado. La variación permitida abarcada por el término “aproximadamente” depende del sistema concreto en estudio y un experto en la técnica podrá apreciarla fácilmente. Cada vez que se cita un intervalo dentro de esta aplicación, cada número entero entero dentro del intervalo también se contempla como una realización de la invención.

Cabe señalar que en esta divulgación, términos como "comprende", "comprendido", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido" "incluyendo" y similares. Dichos términos se refieren a la inclusión de un ingrediente o grupo de ingredientes concreto sin excluir ningún otro ingrediente. Los términos tales como "que consisten esencialmente en" y" consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no resten valor a las características novedosas o básicas de la invención, es decir, excluyen los ingredientes o etapas no citados adicionales que restan valor a las características novedosas o básicas de la invención. Los términos "consiste en" y "que consiste en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos; concretamente, que estos términos están cerrados. En consecuencia, estos términos se refieren a la inclusión de un ingrediente o grupo de ingredientes concreto y a la exclusión de todos los demás ingredientes.

El término "sacárido", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a un polisacárido, un oligosacárido o un monosacárido. Frecuentemente, las referencias a un sacárido se refieren a un polisacárido capsular bacteriano, en particular polisacáridos capsulares derivados de bacterias patógenas como *S. pneumoniae o N. meningitis*.

Los términos "conjugado" o "glucoconjugado" se usan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora. Los glucoconjugados de la presente invención a veces se denominan en el presente documento glucoconjugados "unidos a eTEC", que comprenden un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora a través de al menos un espaciador eTEC. Los glucoconjugados unidos a eTEC de la invención y las composiciones inmunogénicas que los comprenden pueden contener alguna cantidad de sacárido libre.

El término "sacárido libre" como se usa en el presente documento significa un sacárido que no está conjugado covalentemente a la proteína transportadora o un sacárido que está unido covalentemente a muy pocas proteínas transportadoras unidas en una alta relación sacárido/proteína (> 5: 1), pero está, sin embargo, presente en la composición de glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado de manera no covalente con (es decir, unido de manera no covalente a, adsorbido, o atrapado en o con) el glucoconjugado sacárido conjugado-proteína transportadora. Los términos "polisacárido libre" y "polisacárido capsular libre" se pueden usar en el presente documento para transmitir el mismo significado con respecto a los glucoconjugados en los que el sacárido es un polisacárido o un polisacárido capsular, respectivamente.

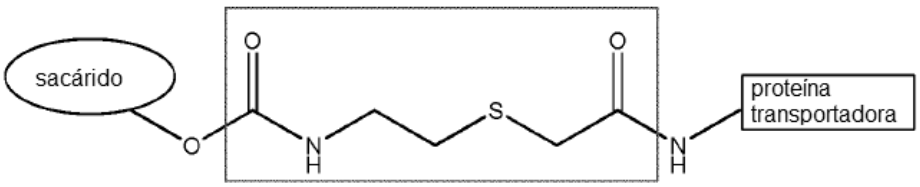
Tal como se usa en el presente documento, "conjugar," "conjugado" y "que conjuga" se refieren a un procedimiento mediante el cual un sacárido, por ejemplo, un polisacárido capsular bacteriano, se une covalentemente a una molécula transportadora o a una proteína transportadora. En los procedimientos de la presente invención, el sacárido se conjuga covalentemente a la proteína transportadora a través de al menos un espaciador eTEC. La conjugación se puede realizar de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. La conjugación con una proteína transportadora aumenta la inmunogenicidad de un polisacárido capsular bacteriano.

Glucoconjugados

La presente invención se refiere a glucoconjugados que comprenden un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora a través de uno o más espaciadores eTEC, en los que el sacárido se conjuga covalentemente al espaciador eTEC a través de un enlace carbamato y en los que la proteína transportadora se conjuga covalentemente al espaciador eTEC a través de un enlace amida.

Además de la presencia de uno o más espaciadores eTEC, las nuevas características de los glucoconjugados de la presente invención incluyen los perfiles de peso molecular de los sacáridos y los glucoconjugados unidos por eTEC resultantes, la proporción de lisinas conjugadas por proteína transportadora y el número de lisinas unidas covalentemente al polisacárido a través del o los espaciadores eTEC, el número de enlaces covalentes entre la proteína transportadora y el sacárido en función de las unidades repetidas del sacárido y la cantidad relativa de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido.

Los glucoconjugados unidos a eTEC de la invención pueden representarse mediante la fórmula general (I):



(I).

El espaciador eTEC incluye siete átomos lineales (es decir, -C(O)NH(CH_2)$_2$SCH_2C(O)-) y proporciona enlaces tioéter y amida estables entre el sacárido y la proteína transportadora. La síntesis del glucoconjugado unido a eTEC implica la reacción de un grupo hidroxilo activado del sacárido con el grupo amino de un reactivo de tioalquilamina, por ejemplo, cistamina o cisteinamina o una de sus sales, formando un enlace carbamato con el sacárido para proporcionar un sacárido tiolado. La generación de uno o más grupos sulfhidrilo libres se lleva a cabo mediante reacción con un agente reductor para proporcionar un sacárido tiolado activado. La reacción de los grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activado con una proteína transportadora activada que tiene uno o más grupos α-haloacetamida en restos que contienen amina genera un enlace tioéter para formar el conjugado, en el que la proteína transportadora está unida al espaciador eTEC a través de un enlace amida.

En los glucoconjugados de la invención, el sacárido puede ser un polisacárido, un oligosacárido, o un monosacárido, y la proteína transportadora pueden seleccionarse de cualquier transportador adecuado como se describe adicionalmente en el presente documento o conocido por los expertos en la técnica. En realizaciones frecuentes, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano. En algunas de dichas realizaciones, la proteína transportadora es CRM_{197}.

En algunas de dichas realizaciones, el glucoconjugado unido a eTEC comprende un polisacárido capsular de Pn derivado de *S. pneumoniae*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Pn 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 realizaciones, el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de serotipo Pn, 10A, 11A, 22F y 33F. En una de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-33F. En otra realización de este tipo, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-22F. En otra realización de este tipo, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-10A. En aún otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Pn-11A.

En otras realizaciones, el glucoconjugado unido a eTEC comprende un polisacárido capsular Mn derivado de *N. meningitidis*. En realizaciones específicas, el polisacárido capsular Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y. En una de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-A. En otra realización de este tipo, El polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-C. En otra realización de este tipo, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-W135. En aún otra de tales realizaciones, el polisacárido capsular es un polisacárido capsular Mn-Y.

En realizaciones particularmente preferidas, el glucoconjugado unido a eTEC comprende un polisacárido capsular bacteriano Pn o Mn, tal como un polisacárido capsular de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F, o un polisacárido capsular de Mn de serotipo A, C, W135 o Y, que está conjugado covalentemente a CRM_{197} a través de un espaciador eTEC.

En algunas realizaciones, los glucoconjugados unidos a eTEC de la presente invención comprenden un sacárido conjugado covalentemente a la proteína transportadora a través de un espaciador eTEC, en los que el sacárido tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En ciertas de dichas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En tales realizaciones adicionales, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. En algunas de dichas realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F, o un polisacárido capsular de Mn de serotipo A, C, W135 o Y, en el que el polisacárido capsular tiene un peso molecular que cae dentro de cualquiera de los intervalos de peso molecular descritos.

En algunas realizaciones, el glucoconjugado unido a eTEC de la invención tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado unido a eTEC tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado unido a eTEC tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones más, el glucoconjugado unido a eTEC tiene un peso molecular de entre 1,000 kDa y 3.000 kDa.

En realizaciones adicionales, el glucoconjugado unido a eTEC de la invención tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 20.000 kDa; entre 200 kDa y 15.000 kDa; entre 200 kDa y 10.000 kDa; entre 200 kDa y 7,500 kDa; entre 200 kDa y 5.000 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 500 kDa y 20.000 kDa; entre 500 kDa y 15.000 kDa; entre 500 kDa y 12.500 kDa; entre 500 kDa y 10.000 kDa; entre 500 kDa y 7.500 kDa; entre 500 kDa y 6.000 kDa; entre 500 kDa y 5.000 kDa; entre 500 kDa y 4.000 kDa; entre 500 kDa y 3.000 kDa; entre 500 kDa y 2.000 kDa; entre 500 kDa y 1.500 kDa; entre 500 kDa y 1.000 kDa; entre 750 kDa y 20.000 kDa; 750 kDa y 15.000 kDa; entre 750 kDa y 12.500 kDa; entre 750 kDa y 10.000 kDa; entre 750 kDa y 7.500 kDa; entre 750 kDa y 6.000 kDa; entre 750 kDa y 5.000 kDa; entre 750 kDa y 4.000 kDa; entre 750 kDa y 3.000 kDa; entre 750 kDa y 2.000 kDa; entre 750 kDa y 1.500 kDa; entre 1.000 kDa y 15.000 kDa; entre 1,000 kDa y 12.500 kDa; entre 1.000 kDa y 10.000 kDa; entre 1.000 kDa y 7.500 kDa; entre 1.000 kDa y 6.000 kDa; entre 1.000 kDa y 5.000 kDa; entre 1.000 kDa y 4.000 kDa; entre 1.000 kDa y 2,500 kDa; entre 2.000 kDa y 15.000 kDa; entre 2.000 kDa y 12.500 kDa; entre 2.000 kDa y 10.000 kDa; entre 2.000 kDa y 7.500 kDa; entre 2.000 kDa y 6.000 kDa; entre 2.000 kDa y 5.000 kDa; entre 2,000 kDa y 4.000 kDa; o entre 2.000 kDa y 3.000 kDa.

Otra forma de caracterizar los glucoconjugados unidos a eTEC de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína transportadora que se conjugan con el sacárido a través de un espaciador eTEC, que puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas.

En realizaciones frecuentes, la proteína transportadora se conjuga covalentemente al espaciador eTEC a través de un enlace amida a uno o más grupos ε-amino de restos de lisina en la proteína transportadora. En algunas de dichas realizaciones, la proteína transportadora comprende de 2 a 20 restos de lisina conjugados covalentemente al sacárido. En ciertas de dichas realizaciones, la proteína transportadora comprende de 4 a 16 restos de lisina conjugados covalentemente al sacárido.

En una realización preferida, la proteína transportadora es CRM_{197}, que contiene 39 restos de lisina. En algunas de dichas realizaciones, el CRM_{197} puede comprender de 4 a 16 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otra forma de expresar este parámetro es que de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 41 % de las lisinas CRM_{197} están unidas covalentemente al sacárido. En otra realización de este tipo, El CRM_{197} puede comprender de 2 a 20 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otra forma de expresar este parámetro es que de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 50 % de las lisinas CRM_{197} están unidas covalentemente al sacárido.

Los glucoconjugados unidos a eTEC de la invención también pueden caracterizarse por la proporción (peso/peso) de sacárido a proteína transportadora. En algunas realizaciones, la proporción de sacárido:proteína transportadora (p/p) está entre 0,2 y 4. En otras realizaciones, la proporción de sacárido:proteína transportadora (p/p) está entre 1,0 y 2,5. En realizaciones adicionales, la proporción de sacárido:proteína transportadora (p/p) está entre 0,4 y 1,7. En algunas de dichas realizaciones, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano y/o la proteína transportadora es CRM_{197}.

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

En realizaciones frecuentes, la proteína transportadora es CRM_{197} y el enlace covalente a través de un espaciador eTEC entre el CRM_{197} y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido.

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

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

Los glucoconjugados unidos a eTEC y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína transportadora, pero sin embargo está presente en la composición de glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado de manera no covalente con (es decir, unido de manera no covalente a, adsorbido, o atrapado en o con el glucoconjugado.

En algunas realizaciones, el glucoconjugado unido a eTEC comprende menos de aproximadamente 45 % de sacárido libre, menos de aproximadamente el 40 % de sacárido libre, menos de aproximadamente el 35 % de sacárido libre,

menos de aproximadamente el 30 % de sacárido libre, menos de aproximadamente el 25 % de sacárido libre, menos de aproximadamente el 20 % de sacárido libre, menos de aproximadamente el 15 % de sacárido libre, menos de aproximadamente el 10 % de sacárido libre, o menos de aproximadamente el 5 % de sacárido libre en relación con la cantidad total de sacárido. Preferentemente, el glucoconjugado comprende menos del 15 % de sacárido libre, más preferentemente menos del 10 % de sacárido libre, y aún más preferentemente, menos del 5 % de sacárido libre.

En determinadas realizaciones preferidas, la invención proporciona un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular, preferentemente un polisacárido capsular Pn o Mn, preferentemente conjugado a una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC, que tiene una o más de las siguientes características solas o en combinación: el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa; el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 500 kDa a 10.000 kDa; la proteína transportadora comprende de 2 a 20 restos de lisina unidos covalentemente al sacárido; la proporción de sacárido:proteína transportadora (p/p) está entre 0,2 y 4; el glucoconjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido por cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido; el sacárido tiene un grado de O-acetilación entre 75-100 %; el conjugado comprende menos de aproximadamente 15 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total; la proteína transportadora es CRM_{197}; el polisacárido capsular se selecciona de los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F, o el polisacárido capsular se seleccionan de los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 o Y.

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

Los glucoconjugados unidos a eTEC y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener restos de sulfhidrilo libres. En algunos casos, los sacáridos tiolados activados formados por los procedimientos proporcionados en el presente documento contendrán múltiples restos de sulfhidrilo libres, algunos de los cuales pueden no experimentar conjugación covalente con la proteína transportadora durante la etapa de conjugación. Dichos restos de sulfhidrilo libres residuales se protegen por reacción con un reactivo de protección reactivo con tiol, por ejemplo yodoacetamida (IAA), para proteger la funcionalidad potencialmente reactiva. Otros reactivos de protección reactivos al tiol, por ejemplo, reactivos que contienen maleimida y similares, también se contemplan.

Además, los glucoconjugados unidos a eTEC y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener proteína transportadora no conjugada residual, que puede incluir proteína transportadora activada que ha sido modificada durante las etapas del procedimiento de protección.

Los glucoconjugados de la invención se pueden usar en la producción de composiciones inmunogénicas para proteger los receptores de infecciones bacterianas, por ejemplo, por bacterias patógenas como *S. pneumonia* o *N. meningitidis*. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente farmacéuticamente aceptable, transportador o diluyente, en la que el glucoconjugado comprende un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC, tal como se describe en el presente documento.

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

En algunas de dichas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular de Pn derivado de *S. pneumoniae*.

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

En ciertas de dichas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular Mn derivado de *N. meningitidis*. En algunas realizaciones específicas, el polisacárido capsular Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y.

En realizaciones particularmente preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a

eTEC que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular Pn o Mn, conjugado covalentemente a CRM_{197} a través de un espaciador eTEC.

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

Los glucoconjugados unidos a eTEC de la invención y las composiciones inmunogénicas que los comprenden pueden contener alguna cantidad de sacárido libre. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente 45 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 35 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 25 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 5 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido. Preferentemente, la composición inmunogénica comprende menos del 15 % de sacárido libre, más preferentemente menos del 10 % de sacárido libre, y aún más preferible, menos del 5 % de sacárido libre.

En otro aspecto, Los glucoconjugados o composiciones inmunogénicas de la invención se pueden usar para generar anticuerpos que son funcionales según se mide matando bacterias en un modelo de eficacia animal o mediante un ensayo de muerte opsonofagocítica. Los glucoconjugados de la invención que comprenden un polisacárido capsular bacteriano pueden usarse en la producción de anticuerpos contra tal polisacárido capsular bacteriano. Dichos anticuerpos pueden utilizarse posteriormente en ensayos de investigación y de laboratorio clínico, tal como detección bacteriana y serotipado. Tales anticuerpos también pueden usarse para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos contra los polisacáridos bacterianos son funcionales en un modelo de eficacia animal o en un ensayo de muerte opsonofagocítica.

Los glucoconjugados unidos a eTEC y las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento también pueden usarse en diversos procedimientos terapéuticos o profilácticos para prevenir, tratar o mejorar una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto. En particular, los glucoconjugados unidos a eTEC que comprenden un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano de una bacteria patógena, puede usarse para prevenir, tratar o mejorar una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto causada por bacterias patógenas.

Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la invención, en la que dicha composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular bacteriano.

En un caso, la infección, enfermedad o afección está asociada con la bacteria *S. pneumonia* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular Pn. En algunos de dichos casos, la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, meningitis, bacteriemia, septicemia, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral.

En otra realización, la infección, enfermedad o afección está asociada con la bacteria *N. meningitidis* y el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular Mn. En algunas de dichas realizaciones, la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en meningitis, meningococcemia, bacteriemia y sepsis.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano.

En aún otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección causada por bacterias patógenas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad o afección causada por una infección con bacterias patógenas, que comprende administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano, por ejemplo, un polisacárido capsular Pn o Mn.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC de la invención a un sujeto para generar una respuesta inmunológica protectora en el sujeto, como se describe adicionalmente en el presente documento.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC de la presente invención, como se describe en el presente documento, para su uso en la prevención, tratamiento o mejora de una infección bacteriana, por ejemplo, una infección por *S. pneumonia* o *N. meningitidis.*

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC de la presente invención, como se describe en el presente documento, para la preparación de un medicamento para la prevención, tratamiento o mejora de una infección bacteriana, por ejemplo, infección por *S. pneumonia* o *N. meningitidis.*

En los procedimientos y usos terapéuticos y/o profilácticos descritos anteriormente, la composición inmunogénica comprende frecuentemente un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular bacteriano unido covalentemente a una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC. En realizaciones frecuentes de los procedimientos y descritos en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular Pn o un polisacárido capsular Mn. En algunas de dichas realizaciones, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En ciertas de dichas realizaciones, el polisacárido capsular Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de serotipo Mn, A, C, W135 e Y.

En determinadas realizaciones preferidas, la proteína transportadora es CRM_{197}. En realizaciones particularmente preferidas, la composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un polisacárido capsular bacteriano, tal como un polisacárido capsular Pn o Mn, conjugado covalentemente a CRM_{197} a través de un espaciador eTEC.

Además, la presente divulgación proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunológica contra bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* en un sujeto, procedimientos para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por la bacteria *S. pneumoniae o N. meningitidis* en un sujeto, y procedimientos para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una infección, enfermedad o afección causada por la bacteria *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* en un sujeto, en cada caso, administrando al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el glucoconjugado comprende un polisacárido capsular bacteriano derivado de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis,* respectivamente.

Sacáridos

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

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

El peso molecular del polisacárido capsular es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular pueden inducir ciertas respuestas inmunológicas de anticuerpos debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. El aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular se contemplan para su uso en los conjugados, composiciones y procedimientos de la presente invención.

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

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

En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares, glucoconjugados o composiciones inmunogénicas de la invención se utilizan para generar anticuerpos que son funcionales según se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de muerte opsonofagocítica que demuestra que los anticuerpos matan a las bacterias.

Los polisacáridos capsulares pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Fournier *y col.,* (1984), *citado anteriormente;* Fournier y col., (1987) Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:561-567; publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2007/0141077; y la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 00/56357). Además, se pueden producir utilizando protocolos sintéticos. Además, el polisacárido capsular se puede producir de forma recombinante utilizando procedimientos de ingeniería genética también conocidos por los expertos en la técnica (véase,Sau y col., (1997) Microbiology 143:2395-2405; y la patente de Estados Unidos n.º 6.027.925).

Las cepas bacterianas de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis* utilizadas para elaborar los polisacáridos respectivos que se usan en los glucoconjugados de la invención pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas o de muestras clínicas.

Proteínas transportadoras

Otro componente del glucoconjugado de la invención es una proteína transportadora con la que se conjuga el sacárido. Las expresiones "transportador proteico" o "proteína transportadora" o "transportador/a" se pueden usar indistintamente en el presente documento. Preferentemente, las proteínas transportadoras son proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y que se pueden obtener en cantidad y pureza suficiente. Las proteínas transportadoras deberán ser susceptibles sufrir procedimientos de conjugación estándar. En los nuevos glucoconjugados de la invención, la proteína transportadora está unida covalentemente al sacárido a través de un espaciador eTEC.

La conjugación a un transportador puede aumentar la inmunogenicidad de un antígeno, por ejemplo, antígeno bacteriano tal como un polisacárido capsular bacteriano. Los transportadores proteicos preferidos para los antígenos son toxinas, toxoides o cualquier material reactivo de reacción cruzada (CRM) de la toxina del tétanos, difteria, pertussis, *Pseudomonas, E. coli, Staphylococcus* y *Streptococcus.* En una realización, un transportador particularmente preferido es el toxoide de la difteria CRM_{197}, derivado de la cepa C7 (β197) de *C. diphtheriae*, que produce la proteína CRM_{197}. Esta cepa tiene el número de acceso ATCC 53281. Un procedimiento para producir CRM_{197} se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.614.382.

Como alternativa, se puede usar un fragmento o epítopo del transportador proteico u otra proteína inmunogénica. Por ejemplo, un antígeno hapténico se puede acoplar a un epítopo de linfocitos T de una toxina bacteriana, toxoide o CRM. Véase, la solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 150.688, presentada el 1 de febrero de 1988, titulado "Péptidos sintéticos que representan un epítopo de linfocitos T como una molécula transportadora para vacunas conjugadas". Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas, tal como el toxoide del cólera (por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente internacional N.º WO 2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También se pueden usar proteínas bacterianas de la membrana externa, como el complejo de la membrana externa c (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de superficie neumocócica A (PspA), proteína de adhesión neumocócica (PsaA) o proteína D de *Haemophilus influenzae*. También se pueden usar como proteínas transportadoras otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD).

En consecuencia, en realizaciones frecuentes, los glucoconjugados unidos a eTEC comprenden CRM_{197} como proteína transportadora, en los que el polisacárido capsular está unido covalentemente al espaciador eTEC a través de un enlace carbamato, y en los que el CRM_{197} está unido covalentemente al espaciador eTEC a través de un enlace amida formado por un residuo de aminoácido activado de la proteína, típicamente a través del grupo ε-amina de uno o más restos de lisina.

El número de restos de lisina en la proteína transportadora que se conjugan con el sacárido se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, En algunas realizaciones de las composiciones inmunogénicas, el CRM_{197} puede comprender de 4 a 16 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otra forma de expresar este parámetro es que de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 41 % de las lisinas CRM_{197} están unidas covalentemente al sacárido. En otras realizaciones, El CRM_{197} puede comprender de 2 a 20 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otra forma de expresar este parámetro es que de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 50 % de las lisinas CRM_{197} están unidas covalentemente al sacárido.

La frecuencia de unión de la cadena de sacárido a una lisina en la proteína transportadora es otro parámetro para caracterizar los glucoconjugados de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos un enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido por cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 15 unidades de repetición de sacárido del

polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

En realizaciones frecuentes, la proteína transportadora es CRM_{197} y el enlace covalente a través de un espaciador eTEC entre el CRM_{197} y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En algunas de dichas realizaciones, el polisacárido es un polisacárido capsular bacteriano derivado de *S. pneumoniae* o *N. meningitidis*.

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

En otra realización, al menos un enlace entre la proteína transportadora y el sacárido se produce 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 sacáridos del polisacárido.

Procedimientos para hacer glucoconjugados unidos eTEC

La presente divulgación proporciona procedimientos para hacer glucoconjugados unidos a eTEC que comprenden un sacárido conjugado covalentemente a una proteína transportadora a través de un espaciador de (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC). El espaciador eTEC contiene siete átomos lineales (es decir, -$C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)$-), que comprende enlaces tioéter y amida estables, y sirve para unir covalentemente el sacárido y la proteína transportadora. Un extremo del espaciador eTEC se une covalentemente a un grupo hidroxilo del sacárido a través de un enlace carbamato. El otro extremo del espaciador eTEC se une covalentemente a un resto que contiene amino de la proteína transportadora, típicamente un resto de ε-lisina, a través de un enlace amida.

Una ruta representativa para la preparación de glucoconjugados de la presente invención, que comprende un polisacárido conjugado con la proteína transportadora activada CRM_{197}, se muestra en la **figura 1**. La estructura química de un polisacárido capsular bacteriano representativo, polisacáridos neumocócicos de los serotipos 33F, 10A, 11A y 22F derivados de *S. pneumoniae*, que tienen sitios potenciales de modificación utilizando el procedimiento espaciador eTEC se muestran en la **Figura 2**, **la figura 3,** la **figura 4** y la **figura 5**, respectivamente.

La estructura de un glucoconjugado unido a eTEC representativo de la invención, que comprende el polisacárido neumocócico serotipo 33F conjugado covalentemente a CRM_{197} usando la química del enlazador eTEC se muestra en la **Figura 6 (A)**. Los posibles sitios de sulfhidrilo libres y sin protección y protegidos se muestran en la **Figura 6(B)** con fines ilustrativos. Los polisacáridos típicamente contienen múltiples grupos hidroxilo y el sitio de unión del espaciador eTEC a un hidroxilo específico dentro de las unidades de repetición de polisacárido a través del enlace carbamato, por lo tanto, puede variar.

En un aspecto, el procedimiento comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con un derivado de ácido carbónico, tal como 1,1'-carbonil-di- (1,2,4-triazol) (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), en un disolvente orgánico para producir un sacárido activado; b) hacer reaccionar el sacárido activado con cistamina o cisteamina o una sal del mismo, para producir un sacárido tiolado; c) hacer reaccionar el sacárido tiolado con un agente reductor para producir un sacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres; d) hacer reaccionar el sacárido tiolado activado con una proteína transportadora activada que comprende uno o más grupos α-haloacetamida, para producir un conjugado de proteína transportadora-sacárido tiolado; y e) hacer reaccionar el conjugado de proteína transportadora-sacárido tiolado con (i) un primer reactivo de protección capaz de proteger los grupos α-haloacetamida no conjugados de la proteína transportadora activada; y/o (ii) un segundo reactivo de protección capaz de proteger los restos de sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado; por lo que se produce un glucoconjugado eTEC unido.

En un caso particularmente preferido, el procedimiento comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un polisacárido capsular Pn-33F con CDT o CDI en un disolvente orgánico para producir un polisacárido Pn-33F activado; b) hacer reaccionar el polisacárido Pn-33F activado con cistamina o cisteinamina una sal del mismo, para producir un polisacárido Pn-33F tiolado; c) hacer reaccionar el polisacárido Pn-33F tiolado con un agente reductor para producir un polisacárido Pn-33F tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres; d) hacer reaccionar el polisacárido Pn-33F tiolado activado con una proteína transportadora CRM_{197} activada que comprende uno o más grupos α-bromoacetamida, para producir un conjugado de polisacárido Pn-33F-CRM_{197} tiolado; y e) hacer reaccionar el conjugado polisacárido Pn-33F tiolado-CRM_{197} con (i) N-acetil-L-cisteína como un primer reactivo de protección capaz de proteger grupos de α-bromoacetamida no conjugados de la proteína transportadora activada; y (ii)

yodoacetamida como un segundo reactivo de protección capaz de proteger restos sulfhidrilo libres no conjugados del polisacárido Pn-33F tiolado activado; por lo que se produce un glucoconjugado de polisacárido Pn-33F-CRM_{197} unido a eTEC.

En casos frecuentes, el derivado de ácido carbónico es CDT o CDI. Preferentemente, el derivado de ácido carbónico es CDT y el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, tal como dimetilsulfóxido (DMSO). No se requiere la liofilización del sacárido activado antes de las etapas de tiolación y/o conjugación.

En un caso preferido, el sacárido tiolado se produce mediante reacción del sacárido activado con el reactivo de tioalquilamina simétrica bifuncional cistamina o una sal del mismo. Una ventaja potencial de este reactivo es que el enlazador de cistamina simétrico puede reaccionar con dos moléculas de sacárido activado, formando de este modo dos moléculas de sacárido tiolado por molécula de cistamina tras la reducción del enlace disulfuro. Como alternativa, el sacárido tiolado se puede formar mediante la reacción del sacárido activado con cisteamina o una sal del mismo. Los glucoconjugados unidos a eTEC producidos por los procedimientos de la divulgación pueden representarse mediante la fórmula general (I).

Los expertos en la técnica entenderán que la etapa c) es opcional cuando el sacárido activado reacciona con cisteamina o una sal de la misma, que contiene restos de sulfhidrilo libres. En la práctica, los sacáridos tiolados que comprenden cisteamina se hacen reaccionar de manera rutinaria con un agente reductor en la etapa c) para reducir cualquier subproducto de disulfuro oxidado que pueda formarse durante la reacción.

En algunos casos de este aspecto, la etapa d) comprende además proporcionar una proteína transportadora activada que comprende uno o más grupos de α-haloacetamida, antes de reaccionar el sacárido tiolado activado con la proteína transportadora activada, para producir un conjugado de proteína transportadora- sacárido tiolado. En casos frecuentes, la proteína transportadora activada comprende uno o más grupos α-bromoacetamida.

El conjugado de proteína transportadora-sacárido tiolado se puede tratar con uno o más reactivos de protección capaces de reaccionar con grupos funcionales activados residuales presentes en la mezcla de reacción. Dichos grupos reactivos residuales pueden estar presentes en componentes de sacárido o proteína transportadora sin reaccionar, debido a la conjugación incompleta o por la presencia de un exceso de uno de los componentes en la mezcla de reacción. En este caso, la protección puede ayudar en la purificación o el aislamiento del glucoconjugado. En algunos casos, los grupos funcionales activados residuales pueden estar presentes en el glucoconjugado.

Por ejemplo, el exceso de grupos α-haloacetamida en la proteína transportadora activada puede protegerse mediante la reacción con un tiol de bajo peso molecular, tales como N-acetil-L-cisteína, que puede usarse en exceso para asegurar una protección completa. La protección con N-acetil-L-cisteína también permite la confirmación de la eficiencia de la conjugación, mediante la detección del aminoácido único S-carboximetilcisteína (CMC) de los restos de cisteína en los sitios protegidos, que puede determinarse mediante hidrólisis ácida y análisis de aminoácidos de los productos de conjugación. La detección de este aminoácido confirma la protección con éxito de los grupos bromoacetamida reactivos, por lo tanto, no están disponibles para cualquier reacción química no deseada. Los niveles aceptables de covalencia y protección están entre aproximadamente 1-15 para CMCA/Lys y aproximadamente 0-5 para CMC/Lys. De forma similar, el exceso de restos de sulfhidrilo libre se puede proteger por reacción con un reactivo electrofílico de bajo peso molecular, tal como yodoacetamida. Una parte de la CMCA se puede derivar de los polisacáridos tioles protegidos directamente por yodoacetamida que no estuvieron involucrados en la conjugación con los grupos haloacilo de la proteína transportadora. Por lo tanto, Las muestras de la reacción de post-conjugación (antes de ser protegidas por yodoacetamida) deben examinarse mediante análisis de aminoácidos (CMCA) para determinar los niveles precisos de tioles involucrados directamente en la conjugación. Para un sacárido tiolado que contiene 10-12 tioles, típicamente se determina que 5-6 tioles están involucrados directamente en la conjugación entre el polisacárido tiol y la proteína bromoacetilada y 4-5 tioles están protegidos por yodoacetamida.

En casos preferidos, el primer reactivo de protección es N-acetil-L-cisteína, que reacciona con grupos de α-haloacetamida no conjugados en la proteína transportadora. En otras realizaciones, el segundo reactivo de protección es yodoacetamida (IAA), que reacciona con grupos sulfhidrilo libres no conjugados del sacárido tiolado activado. Con frecuencia, la etapa e) comprende proteger con N-acetil-L-cisteína como el primer reactivo de protección e IAA como el segundo reactivo de protección. En algunos casos, la etapa de protección e) comprende además la reacción con un agente reductor, por ejemplo, DTT, TCEP o mercaptoetanol, después de la reacción con el primero y/o segundo reactivo de protección.

En algunos casos, el procedimiento comprende además una etapa de purificación del glucoconjugado unido a eTEC, por ejemplo, por ultrafiltración/diafiltración.

En un caso preferido, el reactivo de tioalquilamina simétrico bifuncional es cistamina o una sal de la misma se hace reaccionar con el sacárido activado para proporcionar un sacárido tiolado o una sal de la misma que contiene un resto disulfuro.

La reacción de dichos derivados de sacáridos tiolados con un agente reductor produce un polisacárido tiolado activado que comprende uno o más restos de sulfhidrilo libres. Tales sacáridos tiolados activados se pueden aislar y purificar, por ejemplo, por ultrafiltración/diafiltración.

Como alternativa, los sacáridos tiolados activados se pueden aislar y purificar, por ejemplo, por procedimientos de cromatografía de exclusión por tamaño estándar (SEC) o procedimientos cromatográficos de intercambio iónico tales como DEAE conocidos en la técnica.

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

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

En algunos casos, los procedimientos comprenden además proporcionar una proteína transportadora activada que comprende uno o más grupos α-haloacetamida, preferentemente uno o más grupos α-bromoacetamida.

La reacción del sacárido tiolado activado con una proteína transportadora activada que comprende uno o más restos de α-haloacetamida da como resultado el desplazamiento nucleófilo del grupo α-halo de la proteína transportadora activada por uno o más grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activado, formando el enlace tioéter del espaciador eTEC.

Los restos de aminoácidos α-haloacetilados de la proteína transportadora se unen típicamente a los grupos ε-amino de uno o más restos de lisina de la proteína transportadora. En casos frecuentes, la proteína transportadora contiene uno o más restos de aminoácidos α-bromoacetilados. En un caso, la proteína transportadora se activa con un reactivo de ácido bromoacético, tal como el éster N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS).

En un caso, el procedimiento incluye la etapa de proporcionar una proteína transportadora activada que comprende uno o más grupos α-haloacetamida y hacer reaccionar el polisacárido tiolado activado con la proteína transportadora activada para producir un conjugado de proteína polisacárido-portador tiolado, por lo que se produce un glucoconjugado que comprende un polisacárido conjugado con una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC.

En algunos casos preferidos de los procedimientos del presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular Pn derivado de *S. pneumoniae*. En algunas de dichos casos, el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En determinados casos preferidos, la proteína transportadora es CRM_{197} y el polisacárido capsular Pn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

En otros casos preferidos de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el polisacárido capsular bacteriano es un polisacárido capsular Mn derivado de *N. meningitidis*. En algunos de dichos casos, el polisacárido capsular Mn se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y. En determinados casos preferidos, la proteína transportadora es CRM_{197} y el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y.

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

Por lo tanto, en ciertos casos, los procedimientos comprenden además una etapa de composición del sacárido con triazol o imidazol para dar un sacárido compuesto antes de la etapa de activación a). En algunas de dichas realizaciones, el sacárido compuesto se congela en cáscara, se liofiliza y se reconstituye en un disolvente orgánico (como DMSO) y se añade aproximadamente 0,2 % p/v de agua antes de la activación con el derivado de ácido carbónico, por ejemplo, CDT.

En un caso, la mezcla de reacción del sacárido tiolado se trata opcionalmente con éster metílico de N-acetil-lisina para tapar cualquier sacárido activado que no haya reaccionado. En algunas de dichas realizaciones, la mezcla de sacárido tiolada protegida se purifica mediante ultrafiltración/diafiltración.

En casos frecuentes, el sacárido tiolado reacciona con un agente reductor para producir un sacárido tiolado activado. En algunas de dichas realizaciones, el agente reductor es tris(-2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditiotreitol (DTT) o mercaptoetanol. En algunas de dichas realizaciones, el sacárido tiolado activado se purifica mediante ultrafiltración/diafiltración.

En un caso, el procedimiento para producir un glucoconjugado unido a eTEC comprende la etapa de ajustar y mantener

el pH de la mezcla de reacción de sacárido tiolado activado y proteína transportadora a un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 5 ºC.

En un caso, el procedimiento para producir un glucoconjugado de la invención comprende la etapa de aislar el conjugado de proteína de sacárido tiolado después de que se ha producido. En casos frecuentes, el glucoconjugado se aísla mediante ultrafiltración/diafiltración.

En otro caso, el procedimiento para producir un glucoconjugado unido a eTEC de la invención comprende la etapa de aislar el conjugado de sacárido aislado-proteína transportadora después de que se ha producido. En realizaciones frecuentes, el glucoconjugado se aísla mediante ultrafiltración/diafiltración.

En aún otro caso, el procedimiento para producir el sacárido activado comprende la etapa de ajustar la concentración de agua de la mezcla de reacción que comprende sacárido y CDT en un disolvente orgánico entre aproximadamente 0,1 y 0,4 %. En una realización, la concentración de agua de la mezcla de reacción que comprende sacárido y CDT en un disolvente orgánico se ajusta a aproximadamente el 0,2 %.

En un caso, la etapa de activación del sacárido comprende hacer reaccionar el polisacárido con una cantidad de CDT que es aproximadamente un exceso molar de 5 con la cantidad de polisacárido presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular y CDT en un disolvente orgánico.

En otro caso, el procedimiento para producir el glucoconjugado de la invención comprende la etapa de determinar la concentración de agua de la mezcla de reacción que comprende sacárido. En uno de tales casos, la cantidad de CDT añadida a la mezcla de reacción para activar el sacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que es equimolar a la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende sacárido y CDT en un disolvente orgánico.

En otro caso, la cantidad de CDT añadida a la mezcla de reacción para activar el sacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que se encuentra en una relación molar de aproximadamente 0,5:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende sacárido y CDT en un disolvente orgánico. En un caso, la cantidad de CDT añadida a la mezcla de reacción para activar el sacárido se proporciona en aproximadamente una cantidad de CDT que se encuentra en una relación molar de 0,75:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende sacárido y CDT en un disolvente orgánico.

En un caso, el procedimiento comprende la etapa de aislar el polisacárido tiolado mediante diafiltración. En otra realización, el procedimiento comprende la etapa de aislar el polisacárido tiolado activado mediante diafiltración.

En una realización, la proteína transportadora utilizada en el procedimiento de producción de un conjugado aislado de polisacárido capsular Pn- proteína transportadora comprende CRM_{197}. En otro caso, la proteína transportadora utilizada en el procedimiento de producción de un conjugado aislado de polisacárido capsular Mn- proteína transportadora comprende CRM_{197}.

En algunos casos, la proporción sacárido:proteína transportadora activada (p/p) está entre 0,2 y 4. En otros casos, la proporción sacárido:proteína transportadora activada (p/p) está entre 1,0 y 2,5. En casos adicionales, la proporción sacárido:proteína transportadora activada (p/p) está entre 0,4 y 1,7. En otros casos, la proporción sacárido:proteína transportadora activada (p/p) es de aproximadamente 1:1. En algunos de dichos casos, el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano y la proteína transportadora activada se genera mediante la activación (bromoacetilación) de CRM_{197}.

En otro caso, el procedimiento de producción del sacárido activado comprende el uso de un disolvente orgánico. En casos frecuentes, el disolvente polar es un disolvente aprótico polar. En algunos de dichos casos, el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), acetonitrilo, 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU) y hexametilfosforamida (HMPA), o una mezcla de los mismos. En un caso preferido, el disolvente orgánico es DMSO.

En casos frecuentes, el aislamiento del glucoconjugado unido a eTEC comprende una etapa de ultrafiltración/diafiltración.

En un caso, el sacárido usado en el procedimiento para producir el glucoconjugado de la invención tiene un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 2.000 kDa. En otro caso, el sacárido usado en el procedimiento para producir el glucoconjugado de la invención tiene un peso molecular entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 2.000 kDa.

En un caso, el glucoconjugado producido en el procedimiento de producir glucoconjugado de proteína transportadora-polisacárido capsular tiene un tamaño entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 20.000 kDa. En otro caso, el glucoconjugado producido en el procedimiento de producir glucoconjugado de proteína transportadora-polisacárido capsular tiene un tamaño entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 10.000 kDa. En un caso, el glucoconjugado producido en el procedimiento de producir glucoconjugado de proteína transportadora-polisacárido

capsular tiene un tamaño entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 3.000 kDa.

En otro aspecto, la invención proporciona un glucoconjugado unido a eTEC que comprende un sacárido conjugado con una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC, producido por cualquiera de los procedimientos develados en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un glucoconjugado unido a eTEC producido por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

El grado de O-acetilación del sacárido se puede determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante RMN de protones (Lemercinier y Jones (1996) Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones y Lemercinier (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30; 1233-1247, documento WO 05/033148 o documento WO 00/56357). Otro procedimiento de uso habitual se describe en Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261. Aun otro procedimiento se basa en la cromatografía de exclusión de iones-HPLC. El grado de O-acetilación se determina evaluando la cantidad de acetato libre presente en una muestra y comparando ese valor con la cantidad de acetato liberado después de una hidrólisis básica suave. El acetato se resuelve a partir de otros componentes de la muestra y se cuantifica con una detección Ultra-Violeta (UV) a 210 nm. Otro procedimiento se basa en la cromatografía de exclusión de iones-HPLC. El O-Acetilo se determina evaluando la cantidad de acetato libre presente en una muestra y comparando ese valor con la cantidad de acetato liberado después de una hidrólisis de base suave. El acetato se resuelve a partir de otros componentes de la muestra y se cuantifica con una detección Ultra-Violeta (UV) a 210 nm.

El grado de conjugación se determinó mediante análisis de aminoácidos

La hidrólisis ácida de las muestras de conjugado " antes de la protección con IAA" generadas usando la química de activación de bromoacetilo dio como resultado la formación de S-carboximetilcisteamina (CMCA) ácida establea partir de la cistamina en los sitios conjugados y S-carboximetilcisteína (CMC) ácida estable a partir de las cisteínas en los sitios protegidos. La hidrólisis ácida de los conjugados "después de la protección con IAA" (final) generados usando la química de activación de bromoacetilo dio como resultado la formación de S-carboximetilcisteamina (CMCA) ácida estable a partir de la cistamina en los sitios conjugados y los sitios con protección con IAA y S-carboximetilcisteína (CMC) ácida estable a partir de las cisteínas en los sitios protegidos. Todas las lisinas no conjugadas y no protegidas se convirtieron de nuevo en lisina y se detectaron como tales. Todos los demás aminoácidos se hidrolizaron nuevamente a aminoácidos libres, excepto el triptófano y la cisteína, que se destruyeron por las condiciones de hidrólisis. La asparagina y la glutamina se convirtieron en ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente.

Los aminoácidos de cada muestra hidrolizada y el control se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico, seguido de reacción con una solución de Beckman Ninhydrin NinRX a 135 ºC. Los aminoácidos derivatizados se detectaron en el intervalo visible a 570 nm y 440 nm (consulte la Tabla 1). Se pasó un conjunto patrón de aminoácidos [Pierce Amino Acid Standard H] que contenía 500 picomoles de cada aminoácido junto con las muestras y los controles para cada conjunto de análisis. Al patrón se añadió S-carboximetilcisteína [Sigma-Aldrich].

Tabla 1

Tiempos de retención para los aminoácidos Uso del programa de Gradiente 1 en el analizador de aminoácidos Beckman 6300			
TIEMPO DE RETENCION (MIN)	**AMINOÁCIDO**		**LONGITUD DE ONDA USADA PARA LA DETECCIÓN**
8,3	Carboximetilcisteína	CMC	570
9,6	Ácido aspártico y asparagina	Asx	570
11,3	Treonina	Thr	570
12,2	Serina	Ser	570
15,8	Ácido glutámico y Glutamina	Glx	570 y 440
18,5	Prolina	Pro	440
21,8	Glicina	Gly	570
23,3	Alanina	Ala	570
29,0	Valina	Val	570
32,8	Metionina	Met	570
35,5	Isoleucina	Ile	570
36,8	Leucina	Leu	570
40,5	Tirosina	Tyr	570
42,3	Fenilalanina	Phe	570

(continuación)

Tiempos de retención para los aminoácidos Uso del programa de Gradiente 1 en el analizador de aminoácidos Beckman 6300			
TIEMPO DE RETENCION (MIN)	**AMINOÁCIDO**		**LONGITUD DE ONDA USADA PARA LA DETECCIÓN**
45,4	Carboximetilcisteamina	CMCA	570
48,8	Histidina	His	570
53,6	Lisina	Lys	570
70,8	Arginina	Arg	570

La lisina se eligió para la evaluación en función de su unión covalente a la cisteína y cisteamina y la hidrólisis similar esperada. Por consiguiente, los números resultantes de moles de aminoácidos se compararon con la composición de aminoácidos de la proteína y se indicaron junto con los valores para CMC y CMCA. El valor de CMCA se usó directamente para evaluar el grado de conjugación y el valor de CMC se usó directamente para evaluar el grado de protección.

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

Composiciones inmunogénicas

El término “composición inmunogénica” se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo un microorganismo, o un componente del mismo), que se puede usar para producir una respuesta inmunológica en un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, "inmunogénico" significa la capacidad de un antígeno (o un epítopo del antígeno), tal como un polisacárido capsular bacteriano, o un glucoconjugado o composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular bacteriano, para provocar una respuesta inmunológica en un sujeto huésped, tal como un mamífero, ya sea humoral o celular, o ambas.

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

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, a menos que el contexto indique lo contrario, el término pretende abarcar no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos diseñados por ingeniería (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivatizados para alterar las funciones efectoras, la estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), anticuerpos monocatenarios (ScFv) y anticuerpos de dominio, incluidos los anticuerpos de tiburón y de camélido), y las proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos como se describe en el presente documento, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tales como IgG, IgA o IgM (o subclase de la misma), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. En función por SECuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden además dividirse en “subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en seres humanos. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases

de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, en los que la porción retiene, preferentemente, al menos uno, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas con esa porción cuando están presentes en un anticuerpo intacto.

El término "antígeno" generalmente se refiere a una molécula biológica, usualmente una proteína, péptido, polisacárido o conjugado en una composición inmunogénica, o sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de linfocitos T, o ambos, en un sujeto, Incluyendo composiciones que se inyectan o absorben en el sujeto. La respuesta inmunológica se puede generar a la molécula completa o a una porción de la molécula (por ejemplo, un epítopo o hapteno). El término se puede usar para hacer referencia a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno es reconocido por anticuerpos, receptores de 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 pueden identificarse utilizando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, sintetizando al mismo tiempo un gran número de péptidos en soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aún están unidos a los soportes. Dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.708.871; Geysen y col., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y col., (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De forma similar, los epítopos conformacionales se pueden identificar fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos, tal como, mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *citado anteriormente.* Adicionalmente, a efectos de la presente invención, "antígeno" también se puede usar para hacer referencia a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora, pero pueden ser no conservadoras), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o a través de procedimientos sintéticos particulares, o a través de un enfoque de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de los huéspedes, que producen los antígenos. Adicionalmente, el antígeno puede derivarse, obtenerse o aislarse de un microbio, por ejemplo, una bacteria, o puede ser un organismo completo. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también se incluye en la definición. También se incluyen antígenos sintéticos, por ejemplo, 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) 12ª Conferencia Mundial del SIDA, Ginebra, Suiza, del 28 de junio al 3 de julio de 1998).

Una respuesta inmunológica "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para provocar una respuesta inmunológica, ya sea humoral o celular, o ambas, que sirve para proteger a un sujeto de una infección. la protección conferida no tiene por qué ser absoluta, *es decir,* no tiene por qué prevenir totalmente o erradicar la infección, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población control de sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se ha administrado la vacuna ni la composición inmunogénica. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o la rapidez del inicio de los síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunológica protectora" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno en particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluyendo algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales mensurables para cada antígeno. En situaciones particulares, una "respuesta inmunológica protectora" podría incluir la inducción de una multiplicación por dos de los niveles de anticuerpos o una multiplicación por cuatro de los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno en particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluyendo algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales mensurables para cada antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes se correlacionan con una respuesta inmunológica protectora. Por lo tanto, la respuesta inmunológica protectora puede analizarse midiendo el porcentaje de disminución en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo los que se describen a continuación. Preferentemente, hay una disminución en el recuento de bacterias de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más.

Los términos una "cantidad inmunogénica" y una "cantidad inmunológicamente eficaz" que se usan indistintamente en el presente documento, se refiere a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para provocar una respuesta inmunológica, que puede ser una respuesta celular (linfocitos T) o humoral (linfocitos B o anticuerpos), o ambas, en la que dicha respuesta inmunológica puede medirse mediante ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Normalmente, una cantidad inmunológicamente eficaz provocará una respuesta inmunológica protectora en un sujeto.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar profiláctica o terapéuticamente a un sujeto susceptible a una infección bacteriana, por ejemplo, por bacterias *S. pneumonia* o *N. meningitidis*, por medio de la administración de las composiciones inmunogénicas por vía sistémica, dérmica o mucosa, o pueden usarse para generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales que podría usarse

para conferir inmunidad pasiva a otro sujeto. Estas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. Las composiciones inmunogénicas también se pueden usar para generar anticuerpos que son funcionales según se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o mediante un ensayo de muerte opsonofagocítica.

Cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica concreta se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente separadas.

En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica comprenderá uno o más adyuvantes. Como se define en el presente documento, un “adyuvante” es una sustancia que sirve para potenciar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de la presente invención. Por lo tanto, los adyuvantes a menudo se administran para reforzar la respuesta inmunológica son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los adyuvantes adecuados para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación:

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

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

(a) MF59 (publicación PCT N.º WO 90/14837), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente varias cantidades de MTP-PE (véase más adelante, aunque no es necesario)) formuladas en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador como el microfluidizador, tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, Mass.),

(b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero bloqueado con pluronic L121 al 5 % y thr-MDP (véase más adelante) bien microfluidificado en una emulsión de submicrómetros o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y

(c) Sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, Mont.) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en el monofosforolípido A 3-O-desacilado (MPl™) descrito en la patente de Estados Unidos N.º 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (EPC), preferentemente MPL + EPC (Detox™);

(3) adyuvantes de saponina, tal como Quil A o STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham. Mass) (patente de Estados Unidos n.º 5.057.540) pueden usarse o partículas generados a partir de ellas, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes);

(4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos de lípidos A sintéticos tales como compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa, y que se describen en las patentes de Estados Unidos N.º 6.113.918; uno de estos AGP es 2-[(R) -3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil-2-desoxi-4-O-fosfono-3-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino)-b-D-glucopiranósido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen motivo(s) CpG (patente de Estados Unidos N.º 6.207.646);

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

(6) mutantes destoxificados de una toxina ribosilante de ADP bacteriana, tal como la toxina del cólera (CT), ya sea en forma salvaje o mutante, por ejemplo, en la que el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 es reemplazado por otro aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la solicitud de patente internacional publicada número WO 00/18434 (véanse también los documentos WO 02/098368 y WO 02/098369), la toxina pertussis (PT) o la toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (véase, por ejemplo, los documentos WO 93/13302 y WO 92/19265); y

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

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

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

La composición inmunogénica opcionalmente puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos aprobados por una agencia reguladora de un gobierno federal, un gobierno estatal u otra agencia reguladora, o enumerados en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en sujetos, incluyendo seres humanos, así como mamíferos no humanos. El término vehículo se puede usar para referirse a un diluyente, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Se pueden emplear también como vehículos líquidos soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, 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 inmunogénicas de la invención pueden comprender además uno o más conservantes además de una pluralidad de conjugados de proteína- polisacárido capsular. La FDA exige que los productos biológicos en viales de dosis múltiples (multidosis) contengan un conservante, con solo unas pocas excepciones. Los productos de la vacuna que contienen conservantes incluyen vacunas que contienen cloruro de bencetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, polio (parenteral)), fenol (neumo, tifoidea (parenteral), vaccinia) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, gripe, JE, mening, neumo, rabia). Los conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato fenilmercúrico.

En determinadas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos no iónicos, incluidos, pero sin limitaciones, ésteres de ácidos grasos y polioxietilen sorbitán, Polisorbato-80 (Tween 80), Polisorbato-60 (Tween 60), Polisorbato-40 (Tween 40) y Polisorbato-20 (Tween 20), éteres de polioxietilenalquilo, incluyendo, pero sin limitaciones, Brij 58, Brij 35, así como otros, tales como Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121), con componentes preferidos Polisorbato-80 en una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 % (siendo preferente hasta aproximadamente 0,25 %) o Polisorbato-40 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a 1 % (siendo preferente hasta aproximadamente 0,5 %).

Formas de embalaje y dosificación

La administración directa de composiciones inmunogénicas de la presente invención a un sujeto puede realizarse mediante administración parenteral (intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, o en el espacio intersticial de un tejido); o mediante administración mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario; o por vía tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa.

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

Las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas, por ejemplo, para inyección como soluciones líquidas o como suspensiones. En determinadas realizaciones, la composición puede prepararse como un polvo o aerosol para administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición puede prepararse como supositorio o pesario, o para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como un aerosol, gotas, gel o polvo.

La cantidad de glucoconjugado en cada dosis de composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos importantes. Dicha cantidad puede variar dependiendo del serotipo bacteriano presente en el glucoconjugado. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más particularmente de 1 a 5 µg.

En realizaciones particulares de la presente invención, la composición inmunogénica es una formulación líquida estéril de un polisacárido capsular Pn o Mn conjugado individualmente a CRM_{197} a través de un enlazador eTEC, en la que cada dosis de 0,5 ml está formulada para que contenga 1-5 µg de polisacárido, que puede contener además 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y cloruro de sodio y tampón succinato de sodio como excipientes.

Las cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica concreta se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican observación de respuestas inmunológicas adecuadas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente separadas.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden envasarse en dosis unitarias o en dosis múltiples (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis, o más). Para las formas multidosis, normalmente se prefieren viales a las jeringas precargadas, aunque no necesariamente es preferente. Los formatos de multidosis adecuados incluyen, entre otros, los siguientes: de 2 a 10 dosis por envase, de 0,1 a 2 ml por dosis. En determinadas realizaciones, la dosis es de 0,5

ml. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2007/127668.

Las composiciones pueden presentarse en viales u otros envases de almacenamiento adecuados, o pueden presentarse en dispositivos de administración precargados, por ejemplo, jeringas de uno o varios componentes, que puede suministrarse con o sin agujas. Una jeringa normalmente, pero no necesariamente, contiene una dosis única de la composición inmunogénica que contiene conservante de la invención, aunque también se prevén jeringas precargadas multidosis. Asimismo, un vial puede incluir una dosis única, pero, como alternativa puede incluir dosis múltiples.

De forma rutinaria se pueden emplear volúmenes de dosificación eficaces, pero una dosis típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En determinadas realizaciones, la dosis está formulada para la administración a un sujeto humano. En determinadas realizaciones, la dosis está formulada para su administración a un adulto, joven, adolescente, niño pequeño o lactante (es decir, no más de un año) humano y, en realizaciones preferidas, puede administrarse mediante inyección.

Las composiciones inmunogénicas líquidas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando se use una composición inmunogénica para dicha reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringas ya cargadas, o una o más de cada una, con el contenido de la jeringa que se va a utilizar para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección, o viceversa.

En aún otra realización, se selecciona un envase del formato de multidosis de uno o más del grupo que consiste en, pero sin limitaciones, envases de cristal de laboratorio general, matraces, vasos de precipitados, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, tarros, viales, tapones de viales (por ejemplo, un tapón de goma, tapas roscadas), ampollas, jeringas, jeringas de dos o más cámaras, tapones de jeringa, émbolos de la jeringa, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El envase de la presente invención no está limitado 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 envase del formato es un vial de vidrio Schott de Tipo 1 de 5 ml con tapón de butilo. El experto en la materia apreciará que el formato establecido anteriormente no es de ninguna manera una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como guía para el artesano con respecto a la diversidad de formatos disponibles para la presente invención. Los formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención se pueden encontrar en catálogos publicados de vendedores de equipos de laboratorio y fabricantes tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Procedimientos para inducir una respuesta inmunológica y protección contra la infección

La presente divulgación también incluye procedimientos para usar glucoconjugados unidos a eTEC y composiciones inmunogénicas que los comprenden, ya sea profiláctica o terapéuticamente. Por ejemplo, un aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica contra una bacteria patógena, por ejemplo, bacterias neumocócicas o meningocócicas, que comprende administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento que comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano derivado de bacterias patógenas. Un caso de la divulgación proporciona un procedimiento para proteger a un sujeto contra una infección por bacterias patógenas, o un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección de infección asociada con una bacteria patógena, o un procedimiento para reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por bacterias patógenas, en cada caso, los procedimientos que comprenden administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento que comprenden un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano derivado de las bacterias patógenas.

Un caso de la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección bacteriana, enfermedad o afección en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la invención, en el que dicha composición inmunogénica comprende un glucoconjugado unido eTEC que comprende un antígeno bacteriano, tal como un polisacárido capsular bacteriano.

En algunos casos, el procedimiento de prevención, tratamiento o mejora de una infección bacteriana, enfermedad o afección comprende tratamiento humano, veterinario, animal o agrícola. Otro caso proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección bacteriana, enfermedad o afección asociada con bacterias patógenas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de la composición inmunogénica descrita en el presente documento, y usar dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Un caso de la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir una infección bacteriana en un sujeto sometido a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una cantidad profilácticamente eficaz de una composición inmunogénica descrita en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

En casos preferidos de cada uno de los procedimientos anteriores, las bacterias patógenas son bacterias

neumocócicas o meningocócicas, tales como bacterias *S. pneumoniae* o *N. meningitis.* En algunos de dichos casos, el antígeno bacteriano es un polisacárido capsular seleccionado del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En ciertos de dichos casos, el antígeno bacteriano es un polisacárido capsular seleccionado del grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de Mn de serotipo A, C, W135 e Y.

Una respuesta inmunológica a un antígeno o composición inmunogénica se caracteriza por el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunológica humoral y/o celular a moléculas presentes en el antígeno o composición inmunogénica de interés. A efectos de la presente invención, una "respuesta inmunológica humoral" es una respuesta inmunológica mediada por anticuerpos e implica la inducción y generación de anticuerpos que reconocen y se unen con cierta afinidad por el antígeno en la composición inmunogénica de la invención, mientras que una "respuesta inmunológica celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunológica celular" está provocada por la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas de Clase I o Clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), CD1 u otras moléculas de tipo MHC no clásicas. Esto activa los linfocitos T CD4+ auxiliares específicos de antígeno o los linfocitos T citotóxicos CD8+ ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por los MHC clásicos o no clásicos y se expresan en la superficie de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por los linfocitos T colaboradores. Los linfocitos T auxiliares actúan ayudando a estimular la función y centran la actividad de las células efectoras no específicas contra células que muestran péptidos u otros antígenos en asociación con moléculas MHC clásicas o no clásicas en su superficie. Una "respuesta inmunológica celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas similares producidas por los linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluyendo los procedentes de linfocitos T CD4+ y CD8+. Puede determinarse la capacidad de un antígeno o de una composición concreta para estimular una respuesta inmunológica celular mediante una serie de ensayos conocidos en la técnica, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de linfocitos citotóxicos CTL, determinando los linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado o midiendo la producción de citocinas por parte de linfocitos T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col. (1993) J. Immunol. 151:4189-4199; y Doe y col., (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376.

Las composiciones inmunogénicas y procedimientos de la divulgación pueden ser útiles para uno o más de los siguientes: (i) la prevención de infecciones o reinfecciones, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción de la gravedad, o, la eliminación de los síntomas, y/o (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento se puede efectuar profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (tras la infección). En la presente divulgación, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con un caso particular de la presente divulgación, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, Incluyendo inmunización profiláctica y/o terapéutica, a un sujeto huésped contra la infección bacteriana, por ejemplo, por *S. pneumoniae* o *N. meningitidis*. 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 practicar en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa un animal humano o no humano. De manera más particular, sujeto se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de investigación, zoo, de deportes y de compañía, y tales como, mascotas domésticas y otros animales domésticos, incluyendo, pero sin limitaciones, vacas, ovejas, hurones, cerdos, caballos, conejos, cabras, perros, gatos y similares. Los animales de compañía preferidos son perros y gatos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

La cantidad de un conjugado particular en una composición generalmente se calcula con base en la cantidad total de polisacárido, tanto conjugado como no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado con un 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 de polisacárido. La contribución de la proteína al conjugado generalmente no se considera cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad inmunogénica de un conjugado o composición inmunogénica puede variar dependiendo del serotipo bacteriano. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más particularmente de 1 a 10 µg. La cantidad inmunogénica de los diferentes componentes polisacáridos en una composición inmunogénica puede 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 antígeno polisacárido particular.

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

La efectividad de un antígeno como inmunógeno puede medirse mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos

citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de un linfocito T de lisar su célula diana específica, o midiendo los niveles de actividad del linfocito B midiendo los niveles de anticuerpos circulantes específicos para el antígeno en suero. También se puede detectar una respuesta inmunitaria midiendo los niveles séricos de anticuerpos específicos de antígeno inducidos después de la administración del antígeno, y, más específicamente, midiendo la capacidad de los anticuerpos inducidos para aumentar la capacidad opsonofagocítica de glóbulos blancos particulares, tal como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunológica puede medirse exponiendo al huésped inmunizado con el antígeno que se ha administrado. Por ejemplo, si el antígeno frente al que se desea una respuesta inmunológica es una bacteria, el nivel de protección inducido por la cantidad inmunogénica del antígeno se mide detectando el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de la exposición de los animales con las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección puede medirse midiendo al menos un síntoma asociado con la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada a la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna multiantígeno o multicomponente o composiciones inmunogénicas variará con respecto a cada uno de los otros componentes y puede determinarse por procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Tales procedimientos incluirían procedimientos para medir la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a los polisacáridos o capsulares glucoconjugados de la presente invención. En algunos de dichos casos, la invención proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a los polisacáridos capsulares de Pn de serotipo 1, 3, 4, 5, 6A. 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F o a los glucoconjugados que los comprenden. En ciertos de dichos casos, la invención proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a los polisacáridos capsulares de serotipo Mn, A, C, W135 o Y y a los glucoconjugados que los comprenden. En algunos casos, los anticuerpos se generan tras la administración a un sujeto de los polisacáridos capsulares o glucoconjugados de la presente invención. En algunos casos, la divulgación proporciona anticuerpos purificados o aislados dirigidos contra uno o más de los polisacáridos capsulares o glucoconjugados de la presente invención. En algunos casos, los anticuerpos de la presente divulgación son funcionales según se miden mediante la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o mediante un ensayo de muerte opsonofagocítica. Los anticuerpos o composiciones de anticuerpos de la divulgación se pueden usar en un procedimiento para tratar o prevenir una infección bacteriana, enfermedad o afección asociada con bacterias patógenas en un sujeto, por ejemplo, por bacterias *S. pneumonia* o *N. meningitidis*, comprendiendo el procedimiento generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales usando dicho anticuerpo o composición de anticuerpo para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la divulgación también pueden ser útiles para los procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, detectar la presencia o cuantificar los niveles de polisacárido capsular o un glucoconjugado de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación también pueden ser útiles para detectar la presencia o cuantificar los niveles de un polisacárido capsular de Pn de serotipo o Mn o un glucoconjugado del mismo. en los que el glucoconjugado comprende el polisacárido capsular bacteriano conjugado a una proteína transportadora a través de un espaciador eTEC.

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

Ensayo de actividad opsonofagocítica (OPA)

Los procedimientos de ensayo de OPA se basaron en los procedimientos descritos previamente por Hu, y col., (Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005; 12 (2): 287-95), con las siguientes modificaciones. Los sueros inactivados por calor se diluyeron en serie 2,5 veces en tampón. Las bacterias diana se añadieron a las placas de ensayo y se incubaron durante 30 minutos a 25 ºC en un agitador. A continuación se añadieron a cada pocillo complemento de conejo neonato (3 a 4 semanas de edad, Pel-freez, 12,5 % de concentración final) y células HL-60 diferenciadas, con una relación aproximada de efector a objetivo de 200:1. Las placas de ensayo se incubaron durante 45 minutos a 37 ºC en un agitador. Para terminar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a todos los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 10 µl a los pocillos de placas Millipore, MultiScreenHTS HV con filtro que contenían 200 l de agua. El líquido se filtró a través de las placas al vacío y se añadieron 150 µl de medio HySoy a cada pocillo y se filtró. Las placas de filtro se incubaron a 37 ºC, con CO_2 al 5 % durante la noche y luego se fijaron con solución de destinción (Bio-Rad). A continuación, las placas se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron una vez. Se obtuvieron imágenes de las colonias y se contaron en un analizador Cellular Technology Limited (CTL) ImmunoSpot Analyzer®. El título de anticuerpos OPA se interpoló a partir del recíproco de las dos diluciones séricas que abarcaban el punto de reducción del 50 % en el número de colonias bacterianas en comparación con los pocillos de control que no contenían el inmunosuero.

Generalmente, la divulgación anterior describe la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplos

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

Activación de sacárido y tiolación con clorhidrato de cistamina

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

Para iniciar la activación, se prepara una solución de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) fresca a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activa con varias cantidades de CDT/CDI (1-10 equivalentes molares) y la reacción se deja continuar durante 1 hora a 23 ± 2 ºC. El nivel de activación puede determinarse mediante HPLC. El diclorhidrato de cistamina se prepara fresco en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. El sacárido activado se hace reaccionar con 1 eq. mol. de diclorhidrato de cistamina. Como alternativa, se hace reaccionar el sacárido activado con 1 eq. mol. de clorhidrato de cisteamina. La reacción de tiolación se deja proceder durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 ºC, para producir un sacárido tiolado. El nivel de tiolación se determina mediante la cantidad añadida de CDT/CDI.

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

Reducción y purificación del sacárido tiolado activado

La mezcla de reacción del sacárido tiolado se diluye 10 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM preenfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y filtrado a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del sacárido tiolado se realiza contra un diavolumen por 40 veces de WFI. A la fracción retenida se añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1-5 eq. mol., después de la dilución por un 10 % en volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Esta reacción de reducción se deja proceder durante 20 ± 2 horas a 5 ± 3 ºC. La purificación del sacárido tiolado activado se realiza preferentemente mediante ultrafiltración/diafiltración frente a fosfato sódico monobásico 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Como alternativa, el sacárido tiolado se purifica mediante procedimientos cromatográficos de exclusión por tamaño estándar (SEC) o procedimientos cromatográficos de intercambio iónico.

Una alícuota de la fracción retenida de sacárido tiolado activado se extrae para determinar la concentración de sacárido y los ensayos de contenido de tiol (Ellman).

Reducción y purificación alternativas del sacárido tiolado activado

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

A la mezcla de reacción del sacárido tiolado, se añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5-10 eq. mol., y se dejó proceder durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 ºC. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó 5 veces mediante la adición a succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y filtrado a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del sacárido tiolado se realizó utilizando un volumen de 40 veces de fosfato de sodio monobásico 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3. Una alícuota de la fracción retenida de sacárido tiolado activado se extrajo para determinar la concentración de sacárido y los ensayos de contenido de tiol (Ellman).

Activación y purificación de la proteína transportadora bromoacetilada

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

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

El grado de activación se determina mediante un ensayo de bromuro total mediante cromatografía líquida de intercambio iónico junto con detección de conductividad suprimida (cromatografía iónica). El bromuro unido en la proteína bromoacetilada activada se escinde de la proteína en la preparación de la muestra de ensayo y se cuantifica junto con cualquier bromuro libre que pueda estar presente. Cualquier resto de bromo unido covalentemente sobre la proteína se libera por conversión a bromuro iónico calentando la muestra en 2-mercaptoetanol alcalino.

Activación y purificación de la CRM_{197} bromoacetilada

La CRM_{197} se diluyó a 5 mg/ml con fosfato 10 mM tamponado con NaCl al 0,9 %, a pH 7 (PBS) y luego se preparó $NaHCO_3$ 0,1 M a pH 7,0 utilizando una solución madre 1 M. Se añadió BAANS a una proporción de CRM_{197}:BAANS de 1:0,35 (p:p) usando una solución madre de BAANS de 20 mg/ml DMSO. La mezcla de reacción se incubó a entre 3 ºC y 11 ºC durante 30 minutos-1 hora, después se purificó por ultrafiltración/diafiltración utilizando una membrana de 10K PMCO y fosfato de sodio 10 mM/NaCl al 0,9 %, a pH 7,0. La CRM_{197} activada purificada se analizó mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración proteica y luego se diluyó con PBS a 5 mg/ml. Se añadió sacarosa al 5 % peso/vol como crioprotector y la proteína activada se congeló y se almacenó a -25 ºC hasta que se necesitó para la conjugación.

La bromoacetilación de los restos de lisina de CRM_{197} fue muy consistente, dando como resultado la activación de 15 a 25 lisinas a partir de 39 lisinas disponibles. La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Conjugación de sacárido tiolado activado con proteína transportadora bromoacetilada

Antes de iniciar la reacción de conjugación, los recipientes de reacción se enfrían previamente a 5 ºC. La proteína transportadora bromoacetilada y el sacárido tiolado activado se añaden posteriormente y se mezclan a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La relación de entrada de sacárido/proteína es 0,9 ± 0,1. El pH de la reacción se ajusta a 8,0 ± 0,1 con una solución de NaOH 1M. La reacción de conjugación se deja proceder a 5 °ºC durante 20 ± 2 horas.

Protección de grupos funcionales reactivos residuales

Los restos bromoacetilados que no han reaccionado en la proteína transportadora se inactivan por reacción con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína como reactivo de protección durante 3 horas a 5 ºC. Los grupos sulfhidrilo libres residuales se protegen con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 °ºC.

Purificación de glucoconjugado unido a eTEC

La mezcla de reacción de conjugación tras la protección con IAA) se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. La ultrafiltración/diafiltración del glucoconjugado se realiza contra succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La fracción retenida de glucoconjugado se filtra a continuación a través de un filtro de 0,2 µm. Se extrae una parte alícuota de glucoconjugado para ensayos. El glucoconjugado restante se almacena a 5 ºC.

Ejemplo 2. Preparación de conjugados de Pn-33F eTEC

Procedimiento de activación

Activación del polisacárido Pn33F

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

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

Tiolación de polisacárido Pn-33F activado

El diclorhidrato de cistamina se preparó fresco en DMSO anhidro y se añadió 1 eq. mol. de diclorhidrato de cistamina a la solución de reacción de polisacárido activado. La reacción se dejó proceder durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 ºC. La solución de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición a succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La solución de reacción diluida se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro PMCO de 100K, utilizando agua para inyectables (WFI).

El nivel de tiolación de los polisacáridos Pn-33F activados en función de los equivalentes molares de CDT se muestra en la **Figura 8**.

Reducción y purificación del polisacárido Pn-33F tiolado activado

A la fracción retenida se añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), se añadió 5 eq. mol., después de la dilución por un 10 % en volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Esta reacción de reducción se dejó proceder durante 2 ± 1 horas a 23 ± 2 ºC. La diafiltración del polisacárido 33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro PMCO 100K. La diafiltración se realizó contra fosfato sódico 10 mM enfriado previamente, a

pH 4,3. La fracción retenida de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para determinar la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

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

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

A la mezcla de reacción del sacárido tiolado, se añadieron 5 eq. mol. de una solución de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) y se dejó proceder durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 ºC. La mezcla de reacción se diluyó después 5 veces mediante la adición a succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y filtrado a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del sacárido tiolado se realizó utilizando un volumen de 40 veces de fosfato de sodio monobásico 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3 con casetes de membrana ultrafiltro PMCO 100K. La fracción retenida de polisacárido 33F tiolado se extrajo tanto para determinar la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman). En la **Figura 7(A**) se proporciona un diagrama de flujo del procedimiento de activación.

Procedimiento de conjugación

Conjugación del polisacárido Pn33F tiolado con CRM_{197} bromoacetilada

La proteína transportadora CRM_{197} se activó por separado mediante bromoacetilación, como se describe en el **ejemplo 1,** y a continuación se hizo reaccionar con el polisacárido Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de iniciar la reacción de conjugación, el recipiente de reacción se enfrió previamente a 5 ºC. Se mezclaron CRM_{197} bromoacetilada y polisacárido 33F tiolado en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La relación de entrada sacárido/proteína fue de 0,9 ± 0,1. El pH de la reacción se ajustó a 8,0 - 9,0. La reacción de conjugación se dejó proceder a 5 ºC durante 20 ± 2 horas.

Protección de los grupos reactivos en CRM_{197} bromoacetilada y polisacárido Pn33F tiolado

Los restos bromoacetilados sin reaccionar en las proteínas CRM_{197} se protegieron mediante reacción con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína durante 3 horas a 5 ºC, seguido de protección de cualquier grupo sulfhidrilo libre residual del polisacárido 33F tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 ºC.

Purificación del glucoconjugado Pn-33F unido a eTEC

La solución de conjugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm o 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro 300K PMCO. La diafiltración se realizó contra succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La fracción retenida de glucoconjugado 300K Pn-33F se filtró luego a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 5 ºC.

En la **Figura 7(B)** se proporciona un diagrama de flujo del procedimiento de conjugación.

Resultados

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

Tabla 2. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados de Pn33F e TEC

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

Títulos OPA de los glucoconjugados Pn-33F eTEC a CRM_{197}

Se determinaron los títulos OPA de Pn-33F en condiciones estándar. Los títulos OPA (GMT con IC del 95 %) a cuatro y siete semanas se muestran en la **Tabla 3**, lo que demuestra que el serotipo Pn 33F del glucoconjugado provocaba títulos OPA en un modelo de inmunogenicidad murina.

Tabla 3. Títulos OPA de Pn-33F (GMT con IC del 95 %)

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

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

Procedimiento de activación

Activación del polisacárido Pn-22F

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

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

Tiolación de polisacárido Pn-22F activado

El diclorhidrato de cistamina se preparó fresco en DMSO anhidro y se añadió a la solución de reacción. La reacción se dejó proceder durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 ºC. La solución de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición a succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La solución de reacción diluida se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-22F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro PMCO de 100K, utilizando agua para inyectables (WFI).

Reducción y purificación del polisacárido Pn-22F tiolado activado

A la fracción retenida se añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), se añadieron 5-10 eq. mol. después de la dilución por un 10 % en volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 6,0. Esta reacción de reducción se dejó proceder durante 2 ± 1 horas a 23 ± 2 ºC. La diafiltración del polisacárido 22F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltro PMCO 100K. La diafiltración se realizó contra fosfato sódico 10 mM enfriado previamente, a pH 4,3. La fracción retenida de polisacárido 22F tiolado se extrajo tanto para determinar la concentración de sacárido como para los ensayos de tiol (Ellman).

Conjugación, Protección y purificación de los glucoconjugados Pn-22F eTEC

La conjugación del polisacárido Pn22F tiolado activado con CRM_{197} activada, la protección y la purificación de los glucoconjugados de Pn-22F eTEC se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2**.

Resultados

En la **Tabla 4** se proporciona la caracterización y los datos del procedimiento para los glucoconjugados 22F eTEC a CRM_{197} representativos.

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

Lote del conjugado	**Pn-22F-1A**	**Pn-22F-1B**	**Pn-22F-1C**	**Pn-22F-1D**
PM del polisacárido (kDa)	638,5 kDa	638,5 kDa	638,5 kDa	638,5 kDa
Activación del polisacárido				
Eq. mol. de CDT	0,6 equiv. mol.	0,9 equiv. mol.	1,2 equiv. mol.	1,5 equiv. mol.
Eq. mol. de tiol	1 eq. mol. de cistamina 2H Cl	1 eq. mol. de cistamina 2H Cl	1 eq. mol. de cistamina 2H Cl	1 eq. mol. de cistamina 2H Cl

(continuación)

Lote del conjugado	Pn-22F-1A	Pn-22F-1B	Pn-22F-1C	Pn-22F-1D
Activación del polisacárido				
Eq. mol. del reductor	10 eq. mol. de TCEP	10 eq. mol. de TCEP	10 eq. mol. de TCEP	10 eq. mol. de TCEP
Rendimiento	86 %	89 %	71 %	86 %
Nivel de (activación) de tiol (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,05	0,09	0,12	0,16
Nivel de activación (% de tiol)	5	9	12	16
Conjugación a CRM_{197}				
Relación de entrada	0,75	0,75	0,75	0,75
Resultados de la conjugación				
Rendimiento de sacárido (%)	55 %	48 %	56 %	35 %
Relación sacárido/proteína	1,4	1,2	1,1	1,1
Sacárido libre	29,7 %	16,8 %	9,1 %	10,1 %
Proteína libre	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
PM por SEC-MALLS	1808 kDa	1787 kDa	1873 kDa	2248 kDa

Ejemplo 4. Preparación de conjugados de Pn-10A eTEC a CRM_{197}

Preparación de glucoconjugados Pn-10A eTEC

Los glucoconjugados que comprenden el polisacárido capsular neumocócico serotipo 10A (Pn-10A) conjugado con CRM_{197} a través del espaciador eTEC se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2**.

Caracterización de los glucoconjugados Pn-10A eTEC

En la **Tabla 5** se proporciona la caracterización y los datos del procedimiento para los glucoconjugados Pn-10A eTEC a CRM_{197} representativos.

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

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

Títulos OPA de Pn-10A

Los títulos de OPA frente al conjugado de Pn-10A eTEC con CRM_{197} en ratones se determinaron en condiciones estándar. Los títulos de OPA en función de la dosis se muestran en la **Tabla 6**. Los títulos de OPA fueron significativamente más altos para el conjugado en relación con el polisacárido de serotipo 10A no conjugado.

Tabla 6. Títulos OPA de Pn-10A (GMT con IC del 95 %)

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

Ejemplo 5. Preparación de conjugados de Pn-11A eTEC a CRM_{197}

Preparación de glucoconjugados Pn-11A eTEC

Los glucoconjugados que comprenden el polisacárido capsular neumocócico serotipo 11A (Pn-11A) conjugado con

CRM_{197} a través del espaciador eTEC se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2**.

Caracterización de los glucoconjugados Pn-11A eTEC

En la **Tabla 7** se proporciona la caracterización y los datos del procedimiento para los glucoconjugados Pn-11A eTEC a CRM_{197} representativos.

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

Lote de conjugación	**Pn-11A-1A**	**Pn-11A-1B**	**Pn-11A-2A**	**Pn-11A-2B**
PM del polisacárido	113 kDa	113 kDa	230 kDa	230 kDa
Eq. mol. de CDT	5	5	2	2
Eq. mol. de tiol	0,25	0,07	1	1
Eq. mol. de TCEP	10	10	10	10
Rendimiento	62 %	51 %	86 %	82 %
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,46	0,14	0,13	0,10
Nivel de activación (% de tiol)	46	14	13	10
Conjugación a CRM_{197}				
Relación de entrada de sacárido/proteína	0,75	0,75	0,75	0,75
Rendimiento de sacárido	46,4 %	60,4 %	73,3 %	73,9 %
Relación sacárido/proteína	0,96	1,9	1,18	1,23
Sacárido libre	< 4 %	55 %	16 %	23 %
Proteína libre	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
PM por SEC-MALLS (kDa)	1203	1074	1524	1884

Títulos OPA de Pn-11A

Los títulos de OPA frente al conjugado de Pn-11A eTEC con CRM_{197} en ratones se determinaron en condiciones estándar. Los títulos de OPA en función de la dosis se muestran en la **Tabla 8**.

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

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

Ejemplo 6. Preparación de conjugados de Pn33F RAC/acuoso a CRM_{197}

Preparación de glucoconjugados de Pn33F RAC/acuoso

Los glucoconjugados de Pn-33F se prepararon usando aminación reductora en fase acuosa (RAC/acuoso), que se ha aplicado con éxito para producir una vacuna antineumocócica conjugada (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381). Este enfoque incluye dos etapas. La primera etapa es la oxidación del polisacárido para generar funcionalidad de aldehído a partir de dioles vecinos. La segunda etapa es conjugar el polisacárido activado a los restos de lisina (Lys) de CRM_{197}.

En resumen, el polisacárido congelado se descongeló y la oxidación se llevó a cabo en un tampón fosfato de sodio a pH 6,0 mediante la adición de una cantidad diferente de peryodato de sodio ($NaIO_4$). Se llevó a cabo la concentración y la diafiltración del polisacárido activado y el polisacárido activado purificado se almacenó a 4 ºC. El polisacárido activado se combinó con la proteína CRM_{197}. Se realizó la mezcla completa de polisacárido y CRM_{197}antes de introducir la botella en un baño de hielo seco/etanol, seguido de la liofilización de la mezcla polisacárido/CRM_{197}. La mezcla liofilizada se reconstituyó en tampón de fosfato de sodio 0,1 M. La reacción de conjugación se inició mediante la adición de 1,5 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio y la incubación durante 20 horas a 23 ºC y 44 horas adicionales a 37 ºC. Las reacciones se diluyeron con 1 x volumen de solución salina al 0,9 % y se protegieron con 2 MEq de borohidruro de sodio durante 3 horas a 23 ºC. La mezcla de reacción se diluyó con 1 x volumen de solución salina al 0,9 % y luego se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm antes de la purificación. La concentración y la diafiltración del conjugado se llevaron a cabo utilizando casetes de membrana UF de 100 K MWCO.

Se obtuvieron varios conjugados utilizando el procedimiento descrito anteriormente variando diferentes parámetros (por ejemplo, pH, temperatura de las reacciones y concentración de polisacárido).

El rendimiento típico de polisacárido fue de aproximadamente 50 % para estos conjugados y 15 % de sacárido libre con PM de conjugado en el intervalo de 2000-3500 kDa.

Sin embargo, el polisacárido nativo del serotipo 33F contiene un grupo O-Acetilo en su C2 del resto de 5-

galactofuranosilo y se encontró que aproximadamente el 80 % del grupo funcional acetilo se elimina durante todo el procedimiento de conjugación utilizando aminación reductora en fase acuosa. Se observó que el grupo O-Acetilo en la estructura de anillo de cinco miembros (5-galactofuranósido) puede migrar y eliminarse con facilidad utilizando el procedimiento de química de aminación reductora en fase acuosa.

Evaluación de la estabilidad del glucoconjugado Pn-33F RAC/acuoso

Las partes alícuotas del conjugado RAC/acuoso representativo preparado mediante el procedimiento anterior se dispensaron en tubos de polipropileno. Estos tubos se almacenaron a 25 ºC o a 37º C y la estabilidad se controló durante hasta 3,5 meses. En cada punto de tiempo de estabilidad, se evaluaron los niveles de % de sacáridos libres. Los datos de estabilidad a ambas temperaturas se resumen en la Tabla 9. Como se muestra en la Tabla 9, los niveles de % de sacáridos libres aumentaron significativamente a 25 ºC y 37 ºC. El aumento de los niveles del % de sacáridos libres durante el almacenamiento es un indicador potencial de la degradación del polisacárido en el conjugado.

Tabla 9: Datos de estabilidad para el conjugado RAC/acuoso a 25 ºC y 37 ºC

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

Sin embargo, el polisacárido del serotipo 33F se activó con éxito mediante la reacción con peryodato de sodio y posteriormente se conjugó con CRM_{197} explotando la química de aminación reductora acuosa, el % de estabilidad de sacáridos libres se obtiene en condiciones aceleradas combinado con la incapacidad de preservar la funcionalidad acetilo (un epítopo polisacárido clave para la inmunogenicidad) durante la conjugación sugirió que el procedimiento de RAC/acuoso no es el procedimiento óptimo para la conjugación del serotipo 33F.

Ejemplo 7. Preparación de conjugados de Pn33F RAC/DMSO a CRM_{197}

Preparación de glucoconjugados de Pn33F RAC/DMSO

En comparación con el procedimiento de RAC/acuoso, la conjugación realizada mediante aminación reductora en un DMSO (RAC/DMSO) generalmente tiene una probabilidad significativamente menor de des-O-acetilación. En vista de los desafíos asociados con la preservación de la funcionalidad O-acetilo usando el procedimiento RAC/acuoso descrito en el Ejemplo 6, se evaluó un enfoque alternativo utilizando disolvente RAC/DMSO, que se ha aplicado con éxito para producir una vacuna antineumocócica conjugada (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381).

El polisacárido activado se combinó con sacarosa (50 % p/v en WFI) utilizando una proporción de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Los componentes se mezclaron bien antes de la congelación en cáscara en un baño de hielo seco/etanol. La botella de la mezcla compuesta congelada en cáscara se liofilizó luego a sequedad.

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadió DMSO a la CRM_{197} liofilizada para la reconstitución. El polisacárido activado reconstituido se combinó con CRM_{197} reconstituida en el recipiente de reacción. La conjugación se inició añadiendo $NaCNBH_3$ a la mezcla de reacción. La reacción se incubó a 23 ºC durante 20 horas. La terminación de la reacción de conjugación (protección) se logró mediante la adición de $NaBH_4$ y la reacción se continuó durante otras 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con 4 veces el volumen de tampón succinato 5 mM solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y luego se filtró a través de un filtro de 5 µm antes de la purificación. La concentración y la diafiltración del conjugado se llevaron a cabo utilizando membranas PMCO de 100K. Se realizó diafiltración contra un volumen de diafiltración de 40 veces de tampón succinato 5 mM-solución salina al 0,9 %, a pH 6,0. La fracción retenida te se filtró usando filtros de 0,45 µm y 0,22 µm y se analizó.

Se obtuvieron varios conjugados utilizando el procedimiento descrito anteriormente variando diferentes parámetros (por ejemplo, la relación de entrada sacárido-proteína, la concentración de la reacción, el eq. m. de cianoborohidruro de sodio, y el contenido de agua). Se demostró que los datos globales generados a partir de conjugados preparados mediante el procedimiento de RAC/DMSO son superiores en comparación con el procedimiento RAC/acuoso y se permitió preparar conjugados con un buen rendimiento de conjugación, bajo % de sacárido libre (<5 %) y alto grado de conjugación (lisinas conjugadas). Además, fue posible preservar más del 80 % de la funcionalidad acetilo mediante el procedimiento de conjugación de RAC/DMSO.

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

Las partes alícuotas de los conjugado de RAC/DMSO representativos preparados mediante el procedimiento anterior se dispensaron en tubos de polipropileno, que se almacenaron a 4 ºC o a 25 ºC y la estabilidad se controló durante 3 meses para el sacárido libre. Como se muestra en la Tabla 10, Las muestras almacenadas a 4 ºC mostraron un aumento de sacárido libre del 4,8 % en 3 meses. Sin embargo, las muestras almacenadas a 25 ºC mostraron un aumento del 15,4 % en el % de sacárido libre en tres meses. El aumento en el % de sacárido libre en los conjugados de RAC se atribuye a la degradación del conjugado, particularmente a 25 ºC.

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

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

La estabilidad de otro lote de conjugado RAC/DMSO también se estudió a 4 ºC, 25 ºC y 37 ºC. Se distribuyeron partes alícuotas en tubos de polipropileno y se controlaron las tendencias potenciales en el % de sacárido libre. Como se muestra en la Tabla 11, las muestras almacenadas a 4 °C mostraron un aumento del 4,7 % en el % de sacárido libre en 2 meses. El aumento en el sacárido libre fue significativamente mayor a 25 ºC y 37 ºC, lo que indica la posible degradación del conjugado.

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

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

Aunque los conjugados generados mediante el procedimiento RAC/DMSO preservaron el grupo O-Acetilo, el aumento en el % de sacárido libre observado, particularmente a 25 ºC y superior indicó potencial inestabilidad utilizando esta ruta. En vista de esta observación de la inestabilidad potencial de los conjugados de RAC/DMSO, RAC/DMSO no se consideró óptimo para la conjugación del serotipo 33F y se desarrolló una ruta química alternativa para generar conjugados más estables (los conjugados eTEC).

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

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

Tabla 12. Parámetros experimentales y datos de caracterización de otros conjugados de Pn33F e TEC

Lote del conjugado	33F-8H	33F-91	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-150	33F-16P
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,22	0,11	0,11	0,13	0,14	0,13	0,06	0,13	0,11
Relación sacárido/Proteína (entrada)	0,75	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Rendimiento de sacárido (%)	78 %	88 %	89 %	67 %	69 %	86 %	81 %	91 %	88 %
Relación sacárido/proteína	1,0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,4	2,2	1,9	1,9
Sacárido libre	< 1 %	6,8 %	5,9 %	2,3 %	3,6 %	LOC	8,2 %	3,6 %	6,6 %
PM por SEC-MALLS (kDa)	4729	3293	3295	2246	2498	5539	3070	6009	3789
CMCA/CMC	6,6/LOC	14,2/2,1	15,4/2,1	5,5/1	5,4/1,1	NA/LOC	1,7/1,2	4,1/2,2	2,2/1,2
% Kd (≤ 0,3)	69 %	NA	NA	NA	NA	88 %	87 %	87 %	85 %

(continuación)

Lote del conjugado	33F-8H	33F-91	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-150	33F-16P
Nivel de acetilación (mol de acetato/mol de polisacárido)	0,86	0,93	0,87	1,01	0,99	0,71	0,78	0,8	0,82
LOC = límite de cuantificación.									

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

Ejemplo 9. Evaluación de la estabilidad de los glucoconjugados Pn-33F eTEC: % de tendencias de sacáridos libres

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

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

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

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

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

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

Para confirmar aún más la estabilidad de los conjugados eTEC, se controlaron los lotes de conjugados adicionales (33F-3C y 33F-5E (véase la Tabla 2 y Tabla 12)) almacenados a 4 ºC durante hasta aproximadamente un año, para determinar las potenciales tendencias en el % de sacárido libre. Como se muestra en la Tabla 15, no hubo cambios significativos en el % de niveles de sacáridos libres para los conjugados almacenados a 4 ºC durante un período prolongado de hasta aproximadamente un año.

Tabla 15. Resultados de estabilidad del % de sacárido libre para el glucoconjugado Pn-33F eTEC a 4 ºC

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

En contraste con los conjugados RAC/acuosos y RAC/DMSO, se demostró que los conjugados del serotipo 33F

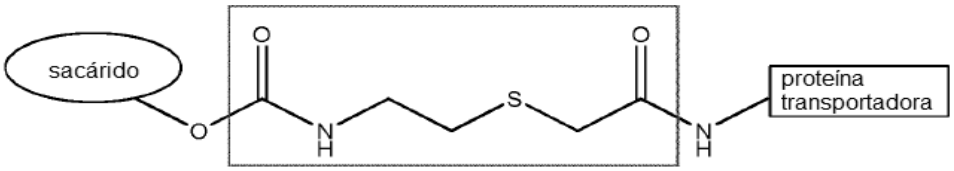
generados por la química 33F eTEC son significativamente más estables sin una degradación perceptible según lo controlado por las tendencias de sacáridos libres a varias temperaturas (tiempo real y acelerado).

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un glucoconjugado unido a (2-((2-oxoetil)tio)etil)carbamato (eTEC) de acuerdo con la fórmula (I):



(I),

en la que los átomos que comprenden el espaciador eTEC están contenidos en la caja central.

2. El glucoconjugado de la reivindicación 1, en el que el sacárido es un polisacárido, un oligosacárido o un monosacárido.

3. El glucoconjugado de la reivindicación 1, en el que el sacárido es un polisacárido capsular bacteriano.

4. El glucoconjugado de la reivindicación 3, en el que el polisacárido bacteriano es un polisacárido capsular neumocócico seleccionado entre el grupo que consiste en los polisacáridos capsulares de un neumococo-serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

5. El glucoconjugado de la reivindicación 3, en el que el polisacárido bacteriano es un polisacárido capsular neumocócico del serotipo 33F.

6. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el polisacárido tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa.

7. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa.

8. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa y 3.000 kDa.

9. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación entre el 75-100 %.

10. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proteína transportadora es CRM_{197}.

11. El glucoconjugado de la reivindicación 10, en el que la CRM_{197} comprende de 2 a 20 residuos de lisina unidos covalentemente al polisacárido a través de un espaciador eTEC.

12. El glucoconjugado de la reivindicación 10, en el que la CRM_{197} comprende de 4 a 16 residuos de lisina unidos covalentemente al polisacárido a través de un espaciador eTEC.

13. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la relación sacárido: proteína transportadora (p/p) está entre 0,2 y 4.

14. El glucoconjugado de la reivindicación 13, en el que la relación sacárido: proteína transportadora (p/p) está entre 0,4 y 1,7.

15. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14, que comprende al menos un enlace covalente entre la proteína transportadora y el polisacárido por cada 4, 10, 15 o 25 unidades repetidas de sacárido del polisacárido.

16. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende menos del 15 % de sacárido libre en comparación con la cantidad total de sacárido.

17. El glucoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que tiene una distribución de tamaño molecular (Kd) de ≥ 35 % a ≤ 0,3.

18. Una composición inmunogénica que comprende el glicoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un excipiente, transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

19. La composición inmunogénica de la reivindicación 18, que comprende además un glucoconjugado adicional de un polisacárido capsular derivado de *S. pneumonia* seleccionado entre el grupo que consiste en polisacáridos capsulares de serotipo neumocócico 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

20. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, que comprende además un adyuvante.

21. La composición inmunogénica de la reivindicación 20, en la que el adyuvante se selecciona entre el grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

22. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 para su uso como medicamento.

FIGURA 1

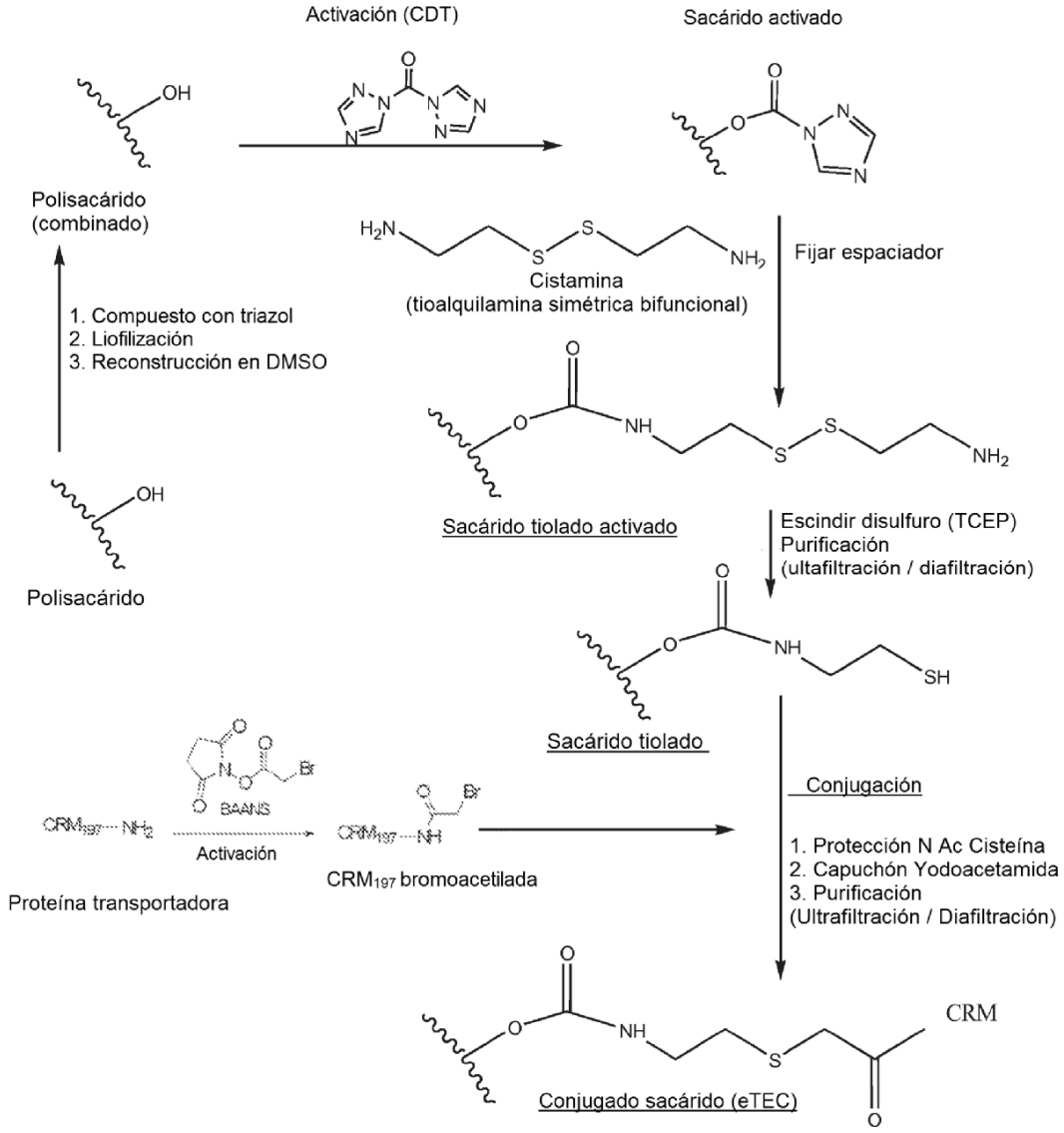

Activación (CDT)
Sacárido activado
Polisacárido
(combinado)
Cistamina
(tioalquilamina simétrica bifuncional)
Fijar espaciador
1. Compuesto con triazol
2. Liofilización
3. Reconstrucción en DMSO
Sacárido tiolado activado
Escindir disulfuro (TCEP)
Purificación
(ultafiltración / diafiltración)
Polisacárido
Sacárido tiolado
BAANS
Activación
Proteína transportadora
CRM197 bromoacetilada
Conjugación
1. Protección N Ac Cisteína
2. Capuchón Yodoacetamida
3. Purificación
(Ultrafiltración / Diafiltración)
CRM
Conjugado sacárido (eTEC)

FIGURA 2

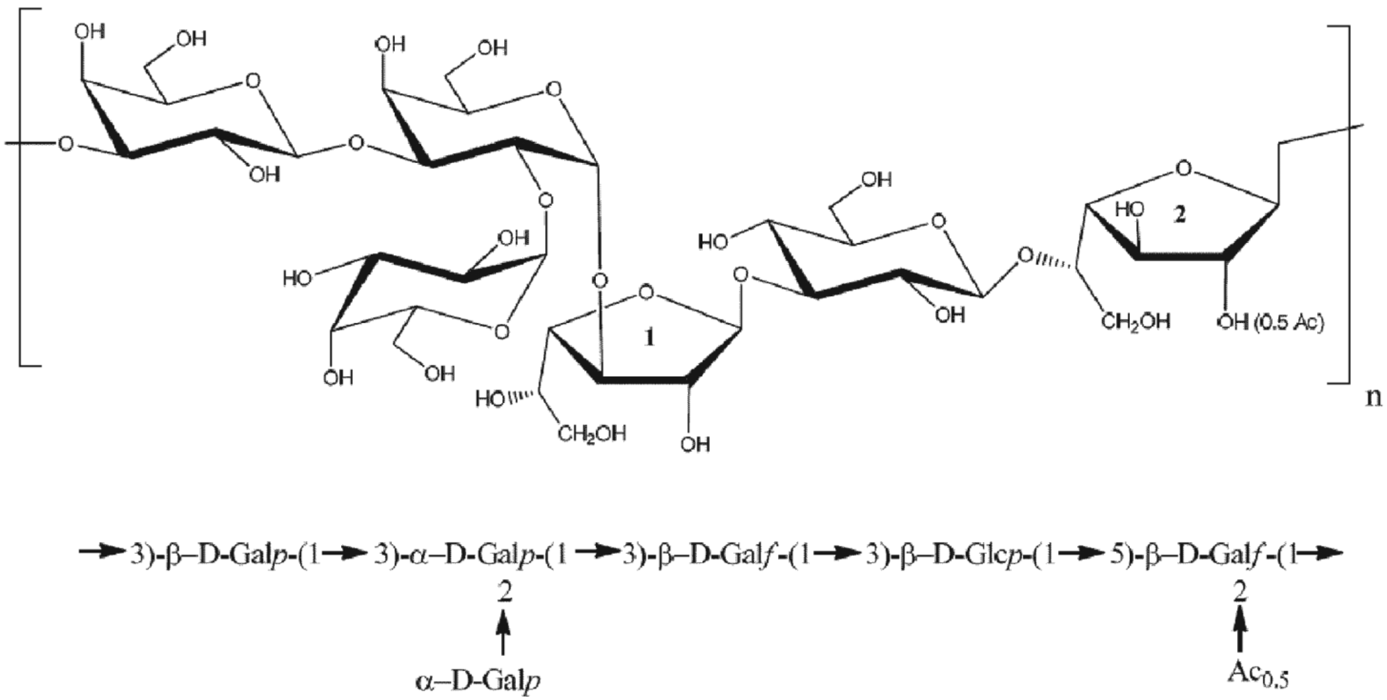
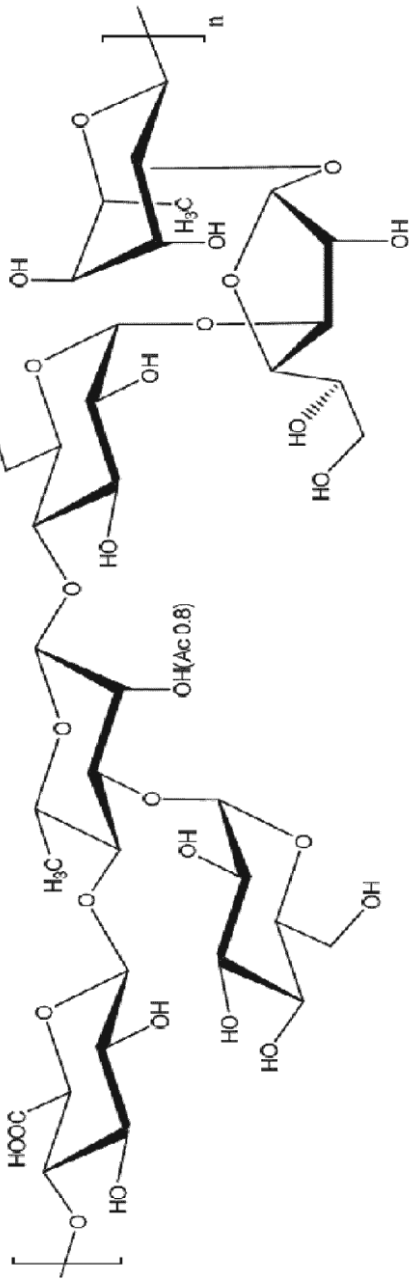

OH
OH
HO
CH2OH
OH (0.5 Ac)
1
2
n
→3)-β–D-Galp-(1→3)-α–D-Galp-(1→3)-β–D-Galf-(1→3)-β–D-Glcp-(1→5)-β–D-Galf-(1→
2
α–D-Galp
2
Ac0,5

FIGURA 3



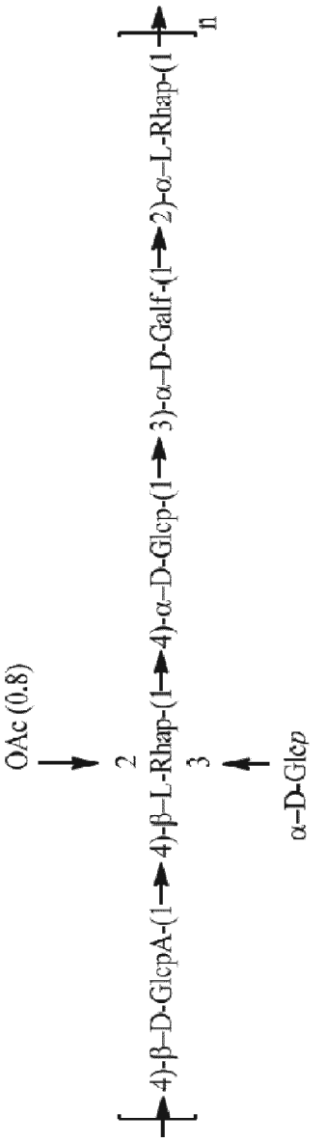

OAc (0.8)
2
4)-β–D-GlcpA-(1→4)-β–L-Rhap-(1→4)-α–D-Glcp-(1→3)-α–D-Galf-(1→2)-α–L-Rhap-(1→
n
3
α–D-Glcp

FIGURA 4

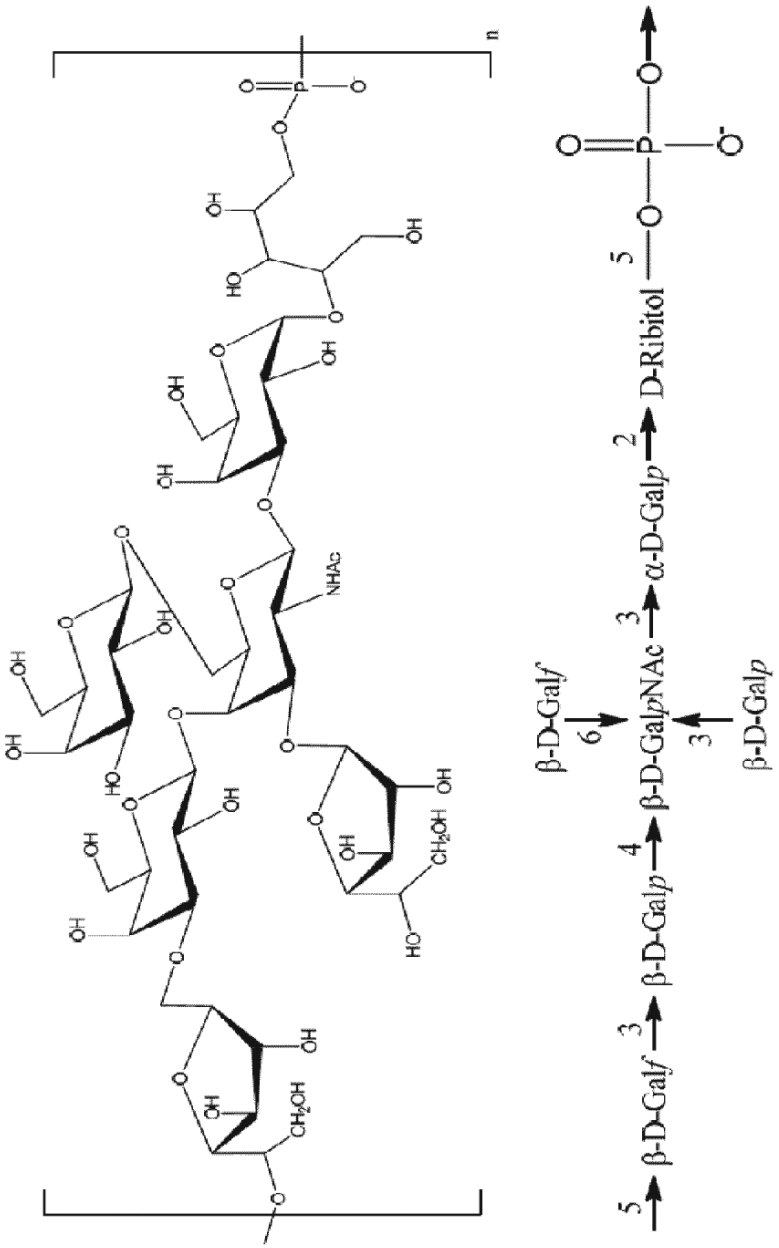

β-D-Galf
6
3
β-D-GalpNAc
3
α-D-Galp
2
D-Ribitol
5
5
β-D-Galf
3
β-D-Galp
4
β-D-Galp
NHAc
CH2OH
n

FIGURA 5

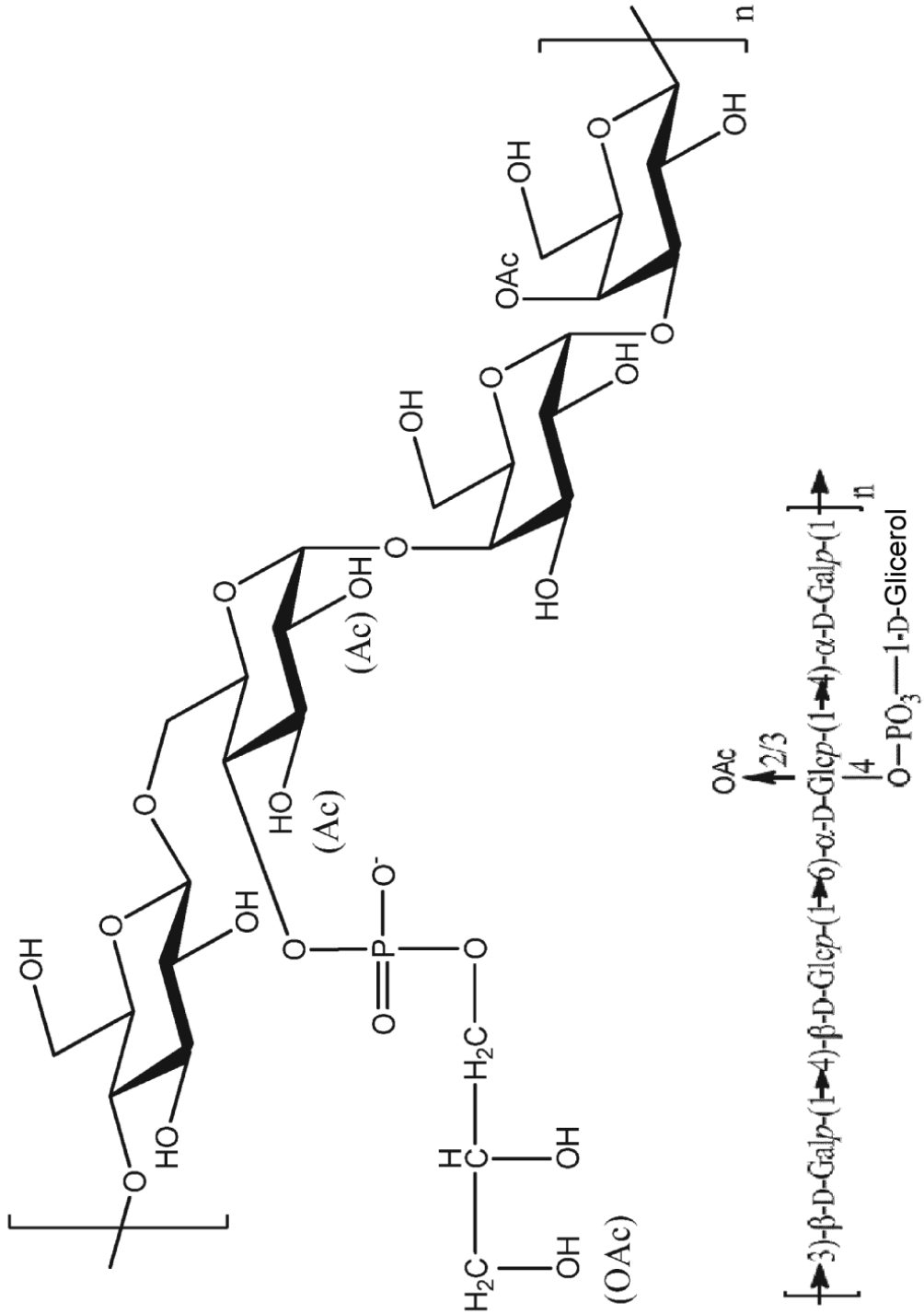

OAc
2/3
3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Galp-(1
4
O—PO3—1-D-Glicerol
n

FIGURA 6A

A)

Conjugado neumo serotipo 33F-CRM_{197} (química de eTEC)

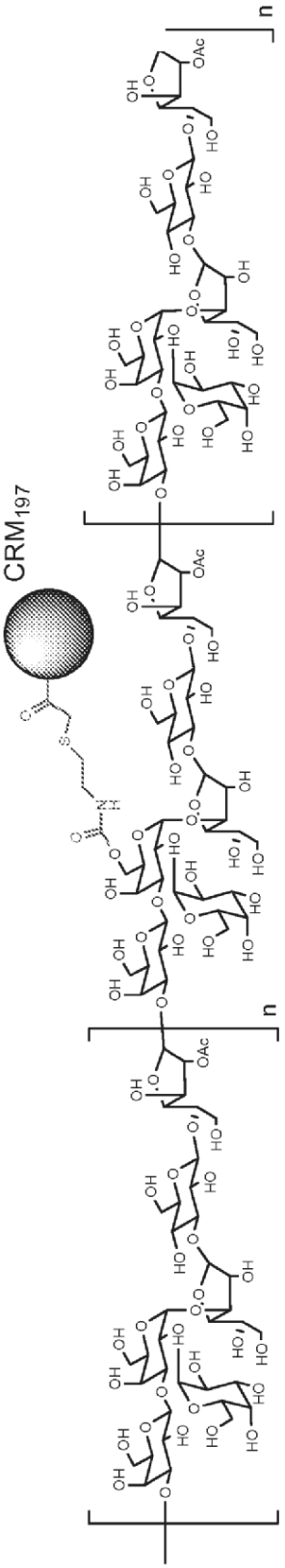


FIGURA 6B

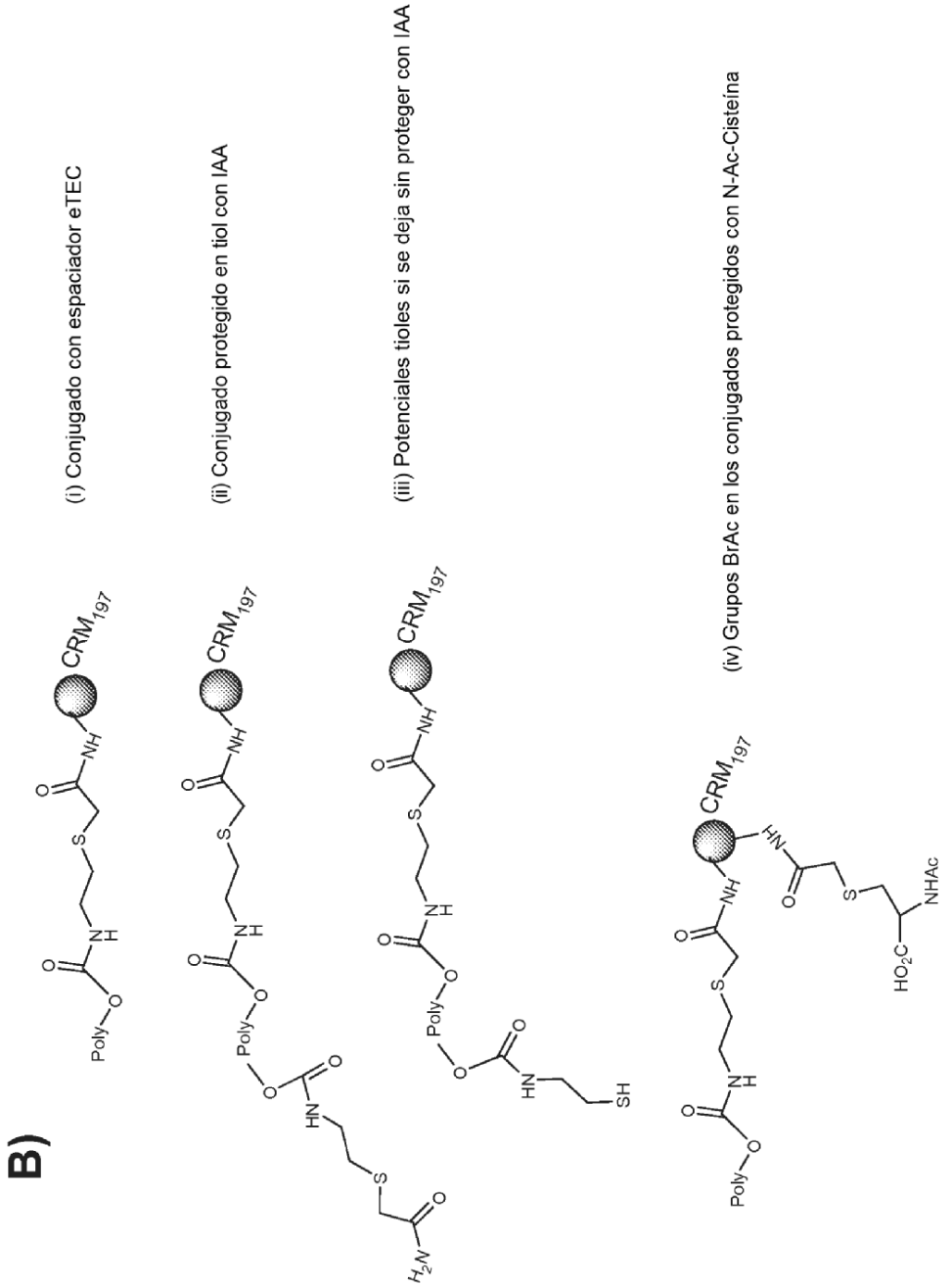

B)
(i) Conjugado con espaciador eTEC
(ii) Conjugado protegido en tiol con IAA
(iii) Potenciales tioles si se deja sin proteger con IAA
(iv) Grupos BrAc en los conjugados protegidos con N-Ac-Cisteína
CRM197
Poly
NH
HN
S
O
SH
NHAc
HO2C
H2N

FIGURA 7

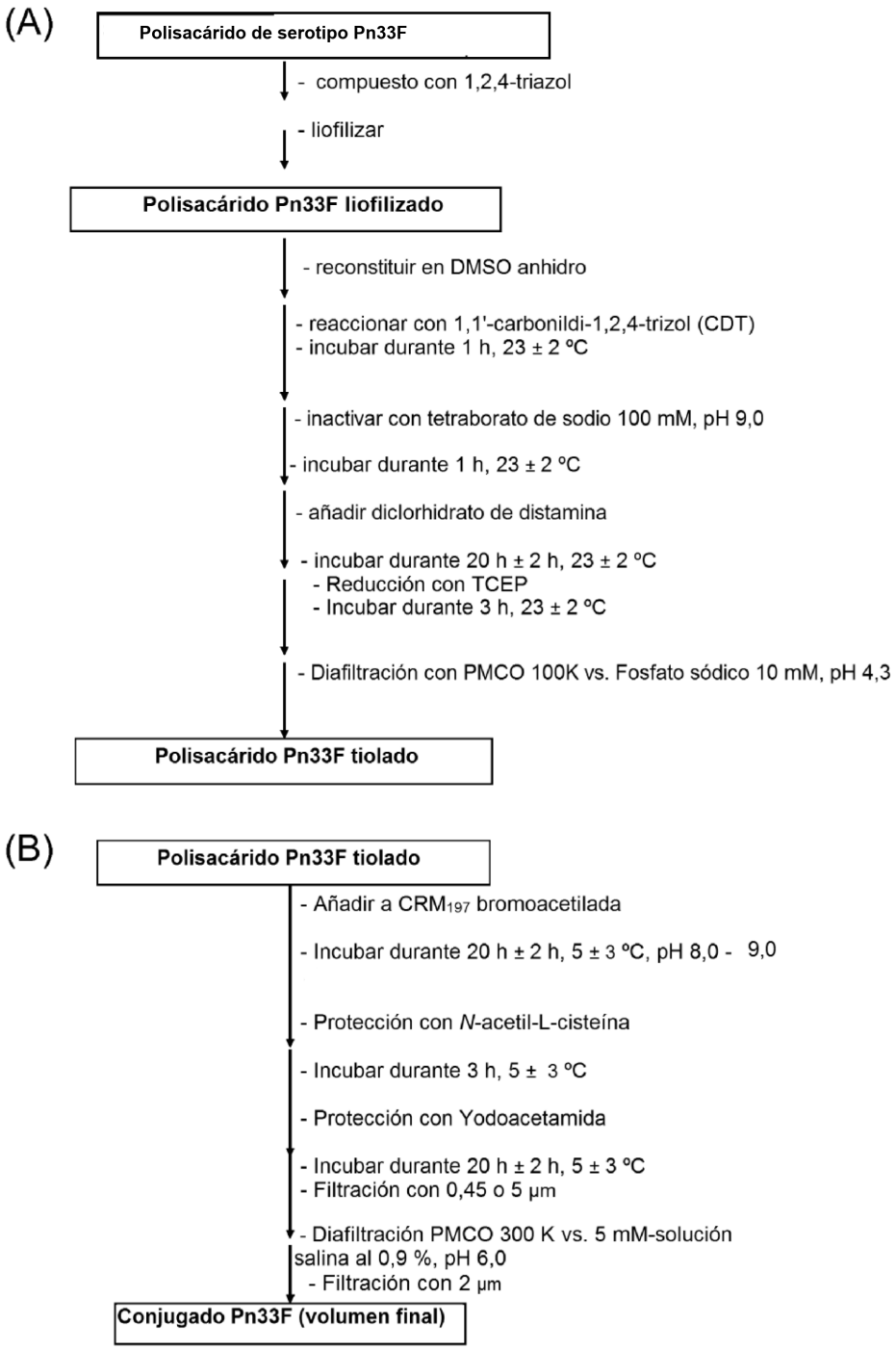
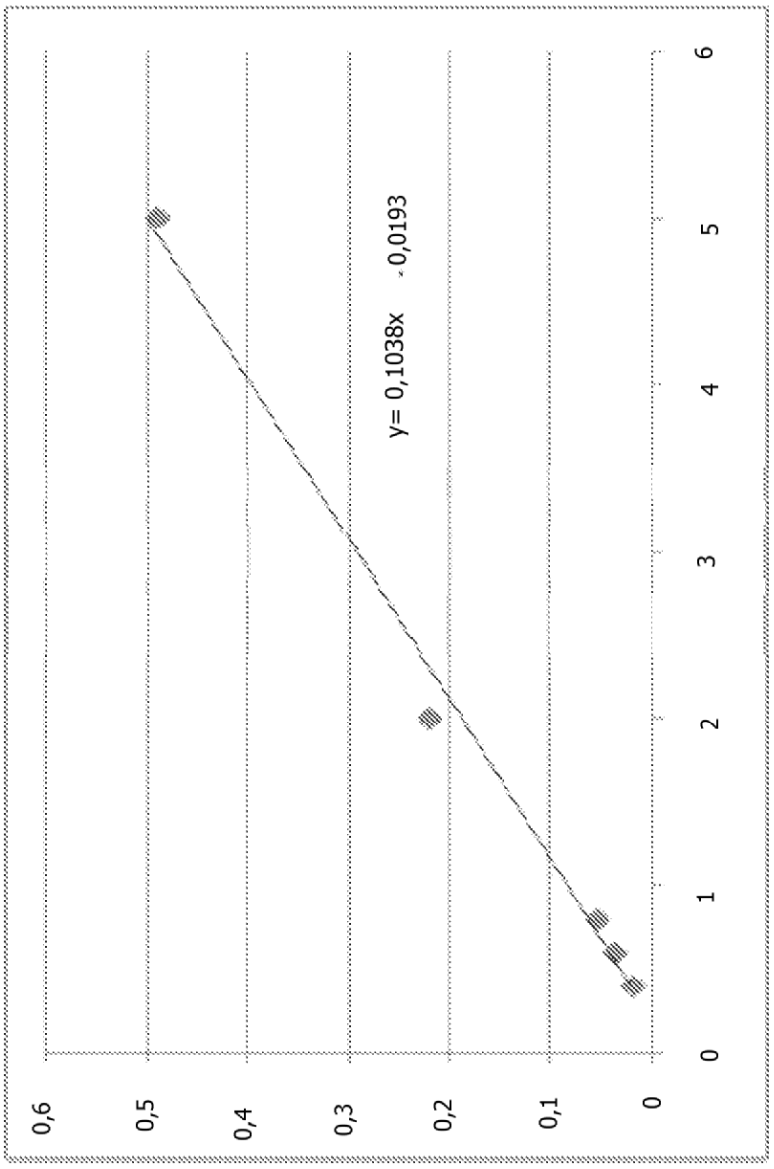

(A)
Polisacárido de serotipo Pn33F
- compuesto con 1,2,4-triazol
- liofilizar
Polisacárido Pn33F liofilizado
- reconstituir en DMSO anhidro
- reaccionar con 1,1'-carbonildi-1,2,4-trizol (CDT)
- incubar durante 1 h, 23 ± 2 ºC
- inactivar con tetraborato de sodio 100 mM, pH 9,0
- incubar durante 1 h, 23 ± 2 ºC
- añadir diclorhidrato de distamina
- incubar durante 20 h ± 2 h, 23 ± 2 ºC
- Reducción con TCEP
- Incubar durante 3 h, 23 ± 2 ºC
- Diafiltración con PMCO 100K vs. Fosfato sódico 10 mM, pH 4,3
Polisacárido Pn33F tiolado
(B)
Polisacárido Pn33F tiolado
- Añadir a CRM197 bromoacetilada
- Incubar durante 20 h ± 2 h, 5 ± 3 ºC, pH 8,0 - 9,0
- Protección con N-acetil-L-cisteína
- Incubar durante 3 h, 5 ± 3 ºC
- Protección con Yodoacetamida
- Incubar durante 20 h ± 2 h, 5 ± 3 ºC
- Filtración con 0,45 o 5 µm
- Diafiltración PMCO 300 K vs. 5 mM-solución salina al 0,9 %, pH 6,0
- Filtración con 2 µm
Conjugado Pn33F (volumen final)

FIGURA 8


y= 0,1038x - 0,0193
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
1
2
3
4
5
6
Nivel de tiolación
CDT, eq.mol