

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 474**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2017** **PCT/US2017/069129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2018** **WO18126229**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2017** **E 17840524 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2025** **EP 3562503**

54 Título: **Conjugados de antígeno-polipéptido con aminoácidos no naturales**

30 Prioridad:

30.12.2016 US 201662441115 P
10.07.2017 US 201762530803 P
04.10.2017 US 201762568201 P
27.11.2017 US 201762591160 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2025

73 Titular/es:

VAXCYTE, INC. (100.00%)
825 Industrial Road, Suite 300
San Carlos, California 94070, US

72 Inventor/es:

FAIRMAN, JEFFERY;
HEINRICHS, JON y
CHAN, WEI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 3 024 474 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de antígeno-polipéptido con aminoácidos no naturales

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las vacunas basadas en macromoléculas antigénicas aisladas (por ejemplo, las vacunas de polisacáridos de meningococo, el neumococo y *Haemophilus* de primera generación) representaron mejoras significativas con respecto a las formulaciones de vacuna anteriores basadas en vacunas de organismos vivos atenuados o inactivados.

10 Las macromoléculas purificadas son significativamente más fáciles de fabricar, tienen un perfil de seguridad mejorado y pueden generar una respuesta inmunitaria específica más productiva (por ejemplo, pueden dirigirse contra un antígeno que esté más conservado o sea importante para la patogénesis). Además, ofrecen una plantilla simplificada para la producción de vacunas, donde puede dirigirse una respuesta inmunitaria contra un sitio específico o un organismo específico simplemente proporcionando el inmunógeno adecuado. Sin embargo, esta estrategia adolece de un inconveniente, no todas las macromoléculas generan una respuesta inmunitaria potente. Muchos lípidos, polisacáridos y ciertos antígenos proteicos (y la mayoría de las moléculas pequeñas) generan respuestas inmunitarias que son intrínsecamente débiles, transitorias y/o defectuosas en ciertas poblaciones de pacientes (los ejemplos incluyen los lactantes o los ancianos). Se piensa que estas respuestas inmunitarias débiles son el resultado de estructuras de antígenos que activan principalmente células B o que de otro modo no logran activar las vías dependientes de las células T implicadas en la memoria inmunológica y la maduración de anticuerpos.

El documento US 2013/189300 describe conjugados que comprenden un antígeno y una molécula portadora, en donde la molécula portadora comprende antígenos de *S. pneumoniae*.

25 Gruber et al. (Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1263, N.º 1, 2012) describen el desarrollo y la evaluación clínica del Prevnar 13, una vacuna conjugada CRM197 neumocócica 13-valente.

30 Park et al. (The Journal of Infectious Diseases, vol. 198, N.º 12, 2008) describen los efectos diferenciales de las vacunas neumocócicas contra los serotipos 6A y 6C.

Dagan et al. (Vaccine, vol. 28, N.º 34, 2010) describen las vacunas glicoconjugadas y la interferencia inmunitaria.

35 Pollabauer et al. (VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 27, N.º 11, 2009) describen la influencia de la proteína portadora sobre la inmunogenicidad de vacunas conjugadas administradas simultáneamente en lactantes.

SUMARIO DE LA INVENCION

40 La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Se considera que las realizaciones y/o los ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la presente invención. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o para diagnóstico.

45 En la presente se describen métodos, composiciones y técnicas para la producción de composiciones inmunogénicas que contienen un aminoácido no natural. La química de unión bio ortogonal incorporada en el aminoácido no natural permite una presentación de antígenos más eficiente y potente al sistema inmunitario, una purificación simplificada y una estructura mejor definida de estos inmunógenos semisintéticos.

50 Se proporciona una composición que comprende múltiples conjugados polipéptido-antígeno, en donde los múltiples conjugados proteína portadora-antígeno comprenden por lo menos 20 o 21 conjugados proteína portadora-antígeno distintos, en donde el antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, y en donde

- 55 (a) el polisacárido capsular de cada conjugado proteína portadora-antígeno distinto proviene de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae*;
 (b) el polipéptido es una proteína portadora que tiene por lo menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1 y que comprende por lo menos un epítipo activador de células T y por lo menos dos nnAA que son ácido 2-amino-3-(4-(azidometil)fenil)propanoico (pAMF), en donde el antígeno se conjuga con el nnAA,
 60 (c) hay un conjugado proteína portadora-antígeno distinto para cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *Streptococcus pneumoniae*; y
 (d) la relación global (peso por peso) entre todos los polisacáridos de serotipo y la proteína portadora en la composición es de por lo menos 0,8.

65 Los conjugados polipéptido-antígeno pueden reticularse mediante enlaces proteína-antígeno-proteína. La

composición comprende múltiples conjugados proteína portadora-antígeno, en donde cada conjugado comprende un antígeno diferente que es un polisacárido capsular de un serotipo neumocócico diferente. El antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*. En otra realización, la composición comprende múltiples conjugados proteína portadora-antígeno como se reivindica en la reivindicación 1, en donde hay por lo menos 20, 21, 24 o 25, conjugados proteína portadora-polisacárido capsular diferentes, cada conjugado comprendiendo un polisacárido capsular diferente de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31, y 33F. En otra realización, la relación entre el polisacárido y la proteína portadora (p/p) es mayor de 1. La proteína portadora comprende por lo menos 2 nnAA que son pAMF. En otra realización, la proteína portadora comprende por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, o por lo menos 9 nnAA que son pAMF. El nnAA es el ácido 2-amino-3-(4-(azidometil)fenil)propanoico (pAMF). La proteína portadora tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En otra realización, la proteína portadora tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, en donde además los por lo menos dos residuos de pAMF sustituyen a un aminoácido de origen natural la misma. En otra realización, los por lo menos dos residuos pAMF sustituyen a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, o K527 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, los por lo menos dos residuos de pAMF sustituyen un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531, o F532 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, los por lo menos dos residuos de pAMF sustituyen un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, K527, F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 o F532 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el antígeno se conjuga con los residuos de pAMF a través de una fracción de enlace. En otra realización, el antígeno se conjuga con los residuos de pAMF a través de una fracción de enlace de triazol.

Los conjugados para las composiciones pueden prepararse mediante un método para producir un conjugado, que comprende: (a) proporcionar un antígeno activado que comprende una pluralidad de grupos funcionales que comprenden una primera asa química capaz de conjugarse con una segunda asa química de un nnAA; (b) combinar el antígeno activado con un polipéptido que comprende por lo menos uno de los nnAA en condiciones en las que la primera y la segunda asacas químicas reaccionan para formar un conjugado antígeno-polipéptido, en donde el polipéptido comprende por lo menos un epítipo activador de células T; y (c) recuperar una composición que comprende el conjugado. El antígeno puede haber reaccionado con un primer reactivo seleccionado del grupo que consiste en CDAP, CDI, o peryodato en la producción del antígeno activado. El primer reactivo puede ser menos de peryodato 1M. La pluralidad de grupos funcionales puede comprender grupos hidroxilo. La pluralidad de grupos funcionales puede comprender un grupo aldehído. El antígeno puede haber reaccionado con un segundo reactivo que comprende un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en propargilo, DIFO, DBCO y DBCO(PEG)_n-NH₂. El antígeno puede haber reaccionado con un segundo reactivo que comprende DBCO-NH₂. La primera asa química puede comprender un grupo alquino. La segunda asa química puede comprender un grupo azido. La relación entre el antígeno y el polipéptido del conjugado en la composición (p/p) puede ser mayor de 1.

El método para producir un conjugado para las composiciones puede comprender: (a) activar un antígeno para incorporar por lo menos una primera asa química en el mismo, en donde la primera asa química es capaz de conjugarse con una segunda asa química de un nnAA en el polipéptido; (b) combinar el antígeno activado con un polipéptido que comprende por lo menos uno de los nnAA en condiciones en las que la primera y la segunda asacas químicas reaccionan para formar un conjugado antígeno-polipéptido, en donde el polipéptido comprende por lo menos un epítipo activador de células T; y (c) recuperar una composición que comprende el conjugado. La activación del antígeno puede comprender incorporar por lo menos un grupo alquilino en el antígeno como primera asa química.

Los conjugados para las composiciones pueden prepararse mediante un método para producir un conjugado antígeno-polipéptido, que comprende activar un antígeno mediante la incorporación de por lo menos un grupo alquilino en el mismo como primera asa química, y la reacción del antígeno con un polipéptido que comprende por lo menos dos residuos de pAMF con un grupo azido como segunda asa química, permitiendo de este modo una reacción de bioconjugación covalente no catalítica entre el polipéptido y el antígeno. El grupo alquilino está preferiblemente restringido para aumentar la reactividad, por ejemplo, en una estructura de anillo como un ciclooctano restringido por diarilo.

También se proporcionan las composiciones reivindicadas para su uso en un método para provocar una respuesta inmuno protectora de anticuerpos contra un antígeno en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto un conjugado como se describe en la presente en un excipiente adecuado para administración parenteral.

Las proteínas portadoras para los conjugados pueden prepararse mediante un método de síntesis de un polipéptido que comprenda por lo menos 2 residuos de pAMF en una mezcla de expresión libre de células mantenida a una temperatura entre aproximadamente 10 grados Celsius y aproximadamente 30 grados Celsius, en donde el polipéptido producido comprende tanto una fracción soluble como una insoluble, y en donde la proporción de la fracción soluble con respecto a la fracción insoluble es de por lo menos el 30% (p/p). Por ejemplo, para 100g de polipéptido total, la fracción insoluble sería de 70g o menos, y la fracción soluble sería de 30g o más. La temperatura puede estar por encima de aproximadamente 20 grados Celsius. La temperatura puede estar por debajo de aproximadamente 20

grados Celsius. La temperatura puede estar entre aproximadamente 14 grados Celsius y aproximadamente 18 grados Celsius. El polipéptido puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende un codón de supresión. La mezcla de expresión libre de células puede comprender un par ARNt ortogonal/aminoacil-ARNt sintetasa específico para el pAMF. La concentración de ARNt puede ser de por lo menos 20 μ M (es decir, la concentración del ARNt ortogonal). La concentración de nnAA puede ser de menos de aproximadamente 2 mM y la concentración de la aminoacil-ARNt sintetasa es menor de aproximadamente 5 μ M (es decir, la concentración de la sintetasa ortogonal). El método puede comprender conjugar el polipéptido con una fracción activa. La fracción activa puede seleccionarse del grupo que consiste en un hapteno, un antígeno bacteriano, un antígeno viral, una toxina peptídica, un macrófido, un polímero y cualquier combinación de los mismos. La mezcla de expresión puede comprender un extracto celular de *E. coli*, germen de trigo o reticulocito de conejo. La mezcla de expresión puede comprender por lo menos un 30% de extracto celular. El polipéptido puede comprender por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, o por lo menos 9 residuos de pAMF. El polipéptido producido puede comprender tanto una fracción soluble como una insoluble, y en donde la proporción entre la fracción soluble y la insoluble es de por lo menos el 60% (p/p). El polipéptido producido puede comprender tanto una fracción soluble como una insoluble, y en donde la proporción entre la fracción soluble y la insoluble es de por lo menos el 80% (p/p). Por ejemplo, para 100g de polipéptido total, la fracción insoluble sería de 20g o menos, y la fracción soluble sería de 80g o más.

Las proteínas portadoras para los conjugados pueden prepararse usando un método para producir una proteína portadora que incorpore una pluralidad de aminoácidos no naturales en su estructura, que comprende: (a) proporcionar un ácido nucleico que codifique una proteína portadora, en donde el ácido nucleico comprende una pluralidad de codones de supresión; (b) crear una mezcla de reacción combinando el ácido nucleico con un extracto bacteriano libre de células que comprenda los aminoácidos no naturales, un ARNt complementario a los codones de supresión y una aminoacil-ARNt sintetasa; y (c) incubar la mezcla de reacción de (b) en condiciones suficientes para incorporar selectivamente el aminoácido no natural en el sitio correspondiente a cada codón de supresión en la proteína portadora. El aminoácido no natural es 4-azidometilfenilalanina (pAMF). El paso (c) puede comprender incubar la mezcla de reacción a menos de 20 grados Celsius. El método puede comprender adicionalmente purificar la proteína portadora inmediatamente después de (c). El codón de supresión puede sustituirse selectivamente en el codón 25, 34, 38, 40, 213, 215, 228, 245, 265, 386, 523, o 527 de la SEQ ID NO:2. La mezcla de reacción en (b) puede comprender además componentes biológicos necesarios para la síntesis de proteínas. El ARNt en (b) puede ser capaz de cargarse con pAMF. La aminoacil-ARNt sintetasa en (b) puede aminoacilar preferentemente el ARNt con pAMF en comparación con los 20 aminoácidos naturales.

En una realización, se proporciona una composición que comprende por lo menos 20, 21, 24 o 25 conjugados proteína portadora-antígeno distintos en los que el antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* en donde (a) el polisacárido capsular en cada conjugado proteína portadora-antígeno distinto es de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae*; (b) la proteína portadora de los conjugados proteína portadora-antígeno es un polipéptido que tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que comprende por lo menos un epítipo activador de células T y por lo menos dos aminoácidos no naturales (nnAA) que son pAMF y los polisacáridos capsulares están conjugados con los nnAA, c) hay un conjugado proteína portadora-antígeno distinto que comprende un polisacárido capsular de cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, y (d) hay por lo menos un conjugado proteína portadora-antígeno distinto adicional que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 2, 6C, 8, 9N, 10A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 20, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 24B, 31, 33F, 34, 35B, 35F y 38, en donde la composición comprende (i) por lo menos 20 o 21 conjugados proteína portadora-antígeno distintos, incluyendo un conjugado para cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *Streptococcus pneumoniae*, o ii) por lo menos 24 conjugados proteína portadora-antígeno distintos, en donde hay un conjugado proteína portadora-antígeno distinto que comprende un polisacárido capsular para cada uno de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F de *Streptococcus pneumoniae*, y en donde la relación global (peso por peso) de todos los polisacáridos de serotipo con respecto a la proteína portadora en la composición es de 0,8.

El polipéptido en el conjugado puede incluir 3 o más residuos de pAMF y el conjugado puede tener un peso molecular de por lo menos 500kDa. El polipéptido puede contener 3 o más residuos de pAMF (por ejemplo, de 3-9 o 3-8 o 3-7 o 3-6 residuos de pAMF). El antígeno es un polisacárido capsular neumocócico. El conjugado puede tener un peso molecular de por lo menos 600kDa, por lo menos 800kDa, por lo menos 900kDa, o por lo menos 1 MDa por ejemplo entre 1-5MDa. Como se analiza más detalladamente en la presente, en composiciones de la presente invención útiles como vacunas multivalentes pueden combinarse múltiples preparaciones de tales conjugados, en donde cada preparación está elaborada con un polisacárido capsular neumocócico de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* diferente. En la presente también se analizan más detalladamente las selecciones preferidas de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* representados en tales conjugados.

El polipéptido en el conjugado puede incluir 4 o más residuos de pAMF (por ejemplo, de 4-9 o 4-8 o 4-7 o 4-6 residuos nnAA). El antígeno es un polisacárido capsular neumocócico. El conjugado puede tener un peso molecular de por lo menos 500 kDa, (por ejemplo, por lo menos 600 kDa, por lo menos 800 kDa, por lo menos 900 kDa, o por lo

menos 1 MDa, por ejemplo, entre 1-5 MDa). Como se analiza más detalladamente en la presente, en composiciones de la presente invención útiles como vacunas multivalentes pueden combinarse múltiples preparaciones de tales conjugados, en donde cada preparación se elabora con un polisacárido capsular neumocócico de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* diferente. En la presente también se analizan más detalladamente las selecciones preferidas de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* representados en tales conjugados.

Una proteína adecuada para preparar un conjugado inmunogénico polisacárido-proteína para las composiciones reivindicadas puede tener una solubilidad de por lo menos 50 mg/l a 20 °C en tampón Tris pH 7.4. El polipéptido comprende 2 o más residuos de pAMF, por ejemplo, de 3-9 o 4-9 o 3-8 o 4-8 o 3-7 o 4-7 o 3-6 o 4-6 residuos de pAMF. La proteína se conjuga con un polisacárido capsular neumocócico, para elaborar un conjugado. La solubilidad puede ser de por lo menos 100mg/l, por lo menos 200 mg/l, o incluso de por lo menos 250 mg/l. Como se analiza más detalladamente en la presente, en las composiciones de la presente invención útiles como vacunas multivalentes pueden combinarse múltiples preparaciones de tales conjugados, en donde cada preparación se elabora con un polisacárido capsular neumocócico de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* diferente. En la presente también se analizan más detalladamente las selecciones preferidas de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* representados en tales conjugados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características y ventajas de las realizaciones descritas en la presente se explican más detalladamente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos acompañantes que exponen realizaciones ilustrativas.

La FIG. 1. muestra el rendimiento de un eCRM que contiene 6 nnAA producido a 30, 25 o 20 grados Celsius en reacciones CFPS suplementadas opcionalmente con cantidades crecientes de ARNt (ARNt) o nnAA/aaRS sintetasa (nnAA). En cada columna se muestran dos barras, que representan tanto el rendimiento total como el soluble.

La FIG. 2 muestra imágenes de gel de coomassie (2A) y fluorescentes (2B) que demuestran el rendimiento relativo de la proteína sintetizada (2A) y la capacidad de pAMF incorporada en eCRM para reaccionar con DBCO-fluoresceína (2B) para eCRM de sitio único producido en reacciones de síntesis de proteínas libre de células (CFPS). En la Figura 2A la escalera muestra de arriba a abajo 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa. En la Figura 2B los marcadores fluorescentes están a 25 y 75 kDa. Los carriles son los siguientes: L = escalera; W = tipo salvaje; C = TAG C-terminal; luego los carriles 1-12 tienen TAG para reemplazar Lys en las posiciones 11, 25, 34, 38, 40, 52, 60, 77, 83, 91, 96 y 103 respectivamente.

La FIG. 3 muestra la actividad opsonofagocítica (OPA) (GMT) después de la administración de conjugados de polisacárido neumocócico-eCRM monovalentes en ratones. Los serotipos se muestran en el eje X. Las barras blancas son polisacáridos adyuvados, mientras que las negras son conjugados adyuvados.

La FIG. 4 muestra las respuestas de IgG (GMT) después de la administración de conjugados de polisacárido neumocócico-eCRM monovalentes en ratones. Los serotipos se muestran en el eje X. Las barras blancas son polisacáridos adyuvados pero no conjugados; las barras negras son conjugados adyuvados.

La FIG. 5 muestra las respuestas de IgG (GMT) después de la administración de vacunas neumocócicas multivalentes en conejos. Cada serotipo (eje X) tiene datos para una vacuna conjugada 24-valente de la invención (izquierda), Prevnar-13™ (centro), y una vacuna no conjugada 24-valente (derecha). Los datos son medias +/- intervalo de confianza del 95%.

La FIG. 6 es similar a la FIG. 5 pero muestra las respuestas de OPA (GMT).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En las vacunas conjugadas de proteínas, la respuesta inmunitaria a un antígeno "débil" se amplifica mediante la unión a un antígeno proteico "fuerte" conocido. En estas biomoléculas semisintéticas, las proteínas que producen respuestas inmunitarias dependientes de células T fuertes y duraderas ("antígenos dependientes de células T") se unen típicamente a un antígeno "débil" mediante química de oxidación/reducción no específica. Las características de activación de las células T de estas proteínas inmunogénicas reclutan células T auxiliares para las células B que reconocen el antígeno débil unido, y permiten así una respuesta inmunitaria fuerte y duradera a una molécula por lo demás débilmente inmunogénica.

Los métodos y los elementos fundamentales actuales usados para la producción de vacunas conjugadas de proteínas dificultan la aplicación más amplia de las vacunas conjugadas para el tratamiento y la prevención de enfermedades. En primer lugar, relativamente pocos antígenos proteicos fuertes son químicamente resistentes, no tóxicos y lo suficientemente escalables como para ser usados como portadores en vacunas conjugadas. En segundo

lugar, la química de oxidación/reducción usada generalmente para la producción de vacunas conjugadas dificulta la conservación de los epítomos en el portador y el antígeno necesarios para una inmunogenicidad máxima. En tercer lugar, la eficacia relativamente baja de estas reacciones de oxidación/reducción complica el control de calidad y la purificación, especialmente a escala comercial.

La producción de proteínas recombinantes permite la optimización de la antigenicidad y la no toxicidad de las proteínas portadoras, pero las proteínas portadoras existentes son difíciles de producir en células recombinantes y las proteínas completamente manipuladas son difíciles de producir con altos rendimientos. Las reacciones de conjugación más suaves minimizan la desnaturalización/obstrucción de los epítomos del portador y del antígeno, pero la menor eficacia de estas reacciones da como resultado una menor carga del antígeno en la proteína portadora y en esquemas de purificación más complicados. Y lo que es más importante, una proporción relativamente menor entre el antígeno y el portador da como resultado una mayor probabilidad de "interferencia" inmunitaria por respuestas de anticuerpos a la propia proteína portadora, o el fenómeno reconocido de supresión epitópica inducida por el portador.

Por tanto, se ha identificado una necesidad de estrategias y reactivos que permitan la combinación de estas tecnologías para producir vacunas conjugadas con mayor inmunogenicidad y más fáciles de fabricar. Por consiguiente, en la presente se describen, entre otras cosas, (1) polipéptidos, incluyendo proteínas portadoras mejoradas, que comprenden aminoácidos no naturales; (2) antígenos que son adecuados para conjugarse con polipéptidos, incluyendo proteínas portadoras mejoradas, que comprenden aminoácidos no naturales; (3) conjugados polipéptido-antígeno de (1) y (2), incluyendo antígenos conjugados con proteínas portadoras mejoradas que comprenden aminoácidos no naturales; (4) composiciones de vacuna que comprenden lo anterior; y (5) métodos para elaborar y usar los anteriores.

1. Definiciones

El término "codón de supresión" se refiere a un triplete de nucleótidos que se introduce en un polinucleótido en una ubicación predeterminada y es reconocido por un ARNt específico que puede reconocer un codón de parada (por ejemplo, un codón de parada ámbar, ocre u ópalo) y permite que la traducción para leer a través del codón para producir la proteína, suprimiendo de este modo el codón de parada.

Un "aminoácido no natural" (nnAA) se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes ni prolisina o selenocisteína; otros términos que se usan como sinónimos del término "aminoácido no natural" son "aminoácido codificado de manera no natural", "aminoácido no natural", "aminoácido de origen no natural" y versiones con guiones y sin guiones de varias maneras de los mismos. Los aminoácidos no naturales con cadenas laterales químicas reactivas bioortogonales pueden usarse como un "asa" química para conjugar varias cargas útiles en sitios discretos de una proteína.

El término "identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias (por ejemplo, BLASTP para secuencias de aminoácidos). A efectos del presente documento, el porcentaje de identidad se determina sobre la secuencia de longitud completa, como la secuencia de referencia expuesta en la SEQ ID NO: 1. El método para calcular la identidad de secuencia, como se proporciona en la presente, es el programa BLASTP que tiene su configuración predeterminada en una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, por ejemplo, Henikoff & Henikoff, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 89: 10915). Véase, por ejemplo, la herramienta de alineación BLAST disponible en la WWW en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi o en otras partes.

El término "antígeno" se refiere a cualquier molécula o fragmento molecular lineal que sea capaz de ser reconocido por los receptores de antígenos altamente variables (receptores de células B, receptores de células T, o ambos) del sistema inmunitario adaptativo. Ejemplos no limitativos de antígenos incluyen polisacáridos o glicanos (por ejemplo, polisacáridos capsulares bacterianos), polinucleótidos, poliaminoácidos, lípidos y moléculas pequeñas (por ejemplo, haptenos, drogas de abuso).

El término "epítipo activador de células T" se refiere a una unidad estructural de la estructura molecular que es capaz de inducir la inmunidad de las células T. La función de las proteínas portadoras que incluyen epítomos activadores de células T es bien conocida y está documentada para conjugados. Sin querer estar limitados por la teoría, un epítipo activador de células T en la proteína transportadora permite que el antígeno unido covalentemente sea procesado por células presentadoras de antígenos y presentado a células T CD4⁺ para inducir memoria inmunológica contra el antígeno.

El término "epítipo de célula B" se refiere en general a aquellas características de una estructura macromolecular que son capaces de inducir una respuesta de células B. Al contrario que un epítipo de células T, un epítipo de células B no necesita comprender un péptido, ya que para el procesamiento de las células presentadoras

de antígeno y la carga en la hendidura de unión a péptidos del MHC no se requiere la activación de las células B.

Como se usa en la presente, "proteína portadora" se refiere a un polipéptido no tóxico o detoxificado que contiene un epítipo activador de células T que puede unirse a un antígeno (por ejemplo, un polisacárido) para mejorar la respuesta humoral al antígeno conjugado en un sujeto. El término incluye cualquiera de las proteínas bacterianas usadas como portadoras de epítopos en vacunas aprobadas por la FDA. Una "proteína portadora nativa" tiene sólo aminoácidos de origen natural. Una "proteína portadora mejorada" tiene por lo menos un aminoácido no natural sustituido por un aminoácido de origen natural en la proteína portadora. La proteína portadora de los conjugados es un polipéptido que tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que comprende por lo menos un epítipo activador de células T y por lo menos dos residuos de pAMF.

Como se usa en la presente, el término "polipéptido inmunogénico" se refiere a un polipéptido que comprende por lo menos un epítipo activador de células T, en donde el epítipo de células T se deriva de una proteína capaz de inducir memoria inmunológica en animales.

Los términos "eCRM" o "CRM mejorado" usados indistintamente en la presente se refieren a una versión modificada de la variante del codón G52E de la toxina diftérica, en donde por lo menos uno de los residuos de aminoácidos naturales se sustituye por un aminoácido no natural y el polipéptido conserva por lo menos un epítipo activador de células T.

Como se usan en la presente, los términos "modificado", "sustituido", "mejorado" y "sustituido" se consideran sinónimos cuando se usan para describir residuos de un polipéptido, y en todos los casos se refieren a la sustitución de un aminoácido no natural por un aminoácido de origen natural dentro de una cadena polipeptídica.

Como se usa en la presente, el término "antígeno T-independiente" se refiere a un antígeno que induce las características de la inmunidad mediada por células B, o que no induce procesos asociados con la inmunidad mediada por células T auxiliares, como el cambio de isotipo o la memoria inmunológica.

El término "polisacárido", como se usa en la presente, se emplea en su sentido ordinario, incluyendo, sin limitación, sacáridos que comprenden una pluralidad de unidades de repetición, incluyendo, pero no limitados a polisacáridos que tienen 50 o más unidades de repetición, y oligosacáridos que tienen 50 o menos unidades de repetición. Típicamente, los polisacáridos tienen de aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 unidades de repetición hasta aproximadamente 2.000 o más unidades de repetición, y opcionalmente de aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 unidades de repetición hasta aproximadamente, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 o 1900 unidades de repetición. Los oligosacáridos tienen típicamente de aproximadamente 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de repetición a aproximadamente 15, 20, 25, 30 o 35 a aproximadamente 40 o 45 unidades de repetición.

Como se usa en la presente, el término "glicano" se refiere a cualquier polímero lineal o ramificado que consiste en residuos de monosacáridos (por ejemplo, glucosa) unidos entre sí por enlaces glucosídicos. Los ejemplos de glicanos incluyen el glucógeno, el almidón, el ácido hialurónico y la celulosa. Otros ejemplos de "glicanos" incluyen los polisacáridos capsulares bacterianos.

Como se usa en la presente, el término "peso molecular" de un polisacárido o de un conjugado proteína portadora-polisacárido se refiere al peso molecular calculado mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con dispersión de luz láser multiángulo (MALS).

El término "alquilo inferior", como se usa en la presente y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono, es decir, alquilo C₁ a C₆. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo inferior es un hidrocarburo primario, secundario o terciario. El término incluye fracciones tanto sustituidas como no sustituidas. Véase también el documento US-2014/0066598. El término "alquileo inferior" se refiere a un radical alquileo de un alquilo inferior.

Los compuestos de las varias realizaciones divulgadas en la presente, o sus sales farmacéuticamente aceptables que contienen uno o más centros asimétricos y dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que se definen, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), o como (D) o (L) para aminoácidos. Se pretende que la presente divulgación incluya todos estos isómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Los aa usados en la presente son generalmente α -aminoácidos con un centro quiral en el carbono α , y son preferiblemente isómeros (L).

El protocolo de nomenclatura química y los diagramas de estructura usados en la presente son una forma modificada del sistema de nomenclatura I.U.P.A.C., usando el programa de software ACD/Name Versión 9.07 y/o el programa de nomenclatura del software ChemDraw Ultra Versión 11.0.1 (CambridgeSoft). Excepto como se describe a continuación, todos los enlaces se identifican en los diagramas de estructura química de la presente, excepto para todos los enlaces en algunos átomos de carbono, que se supone que están unidos a suficientes átomos de hidrógeno

para completar la valencia.

2. Métodos generales

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el significado entendido comúnmente. Para definiciones y términos, los profesionales pueden consultar especialmente Green & Sambrook (eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012), y Ausubel, F. M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 99), John Wiley & Sons, New York (2012), y Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., & Offit, P.A., *Vaccines*, 6ª ed, Elsevier, London (2013). Los métodos estándar también aparecen en Bindereif, Schon, & Westhof (2005) *Handbook of RNA Biochemistry*, Wiley-VCR, Weinheim, Alemania, que describe métodos detallados para la manipulación y el análisis del ARN. Ejemplos de técnicas moleculares adecuadas para generar ácidos nucleicos recombinantes, e instrucciones para muchos ejercicios de clonación se encuentran en Green & Sambrook (Id); Ausubel, F. M., et al., (Id.); Berger & Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* (Volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif 1987); y *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, San Diego, Calif 1990). Ejemplos de técnicas bioorgánicas adecuadas para activar y derivatizar biomoléculas con asas químicas, e instrucciones para diseñar tales síntesis se encuentran en Hermanson, G.T, *Bioconjugate Techniques*, 2ª ed., Elsevier, London (2008). Para ejemplos de técnicas y componentes necesarios para la administración parenteral de biomoléculas descritas en la presente, los profesionales pueden consultar Remington, *Essentials of Pharmaceutics*, Pharmaceutical Press, Londres (2012). Los métodos de purificación de proteínas, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización se describen en Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. Los métodos para la síntesis libre de células se describen en Spirin & Swartz (2008) *Cell-free Protein Synthesis*, Wiley-VCR, Weinheim, Alemania. Los métodos para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas usando síntesis libre de células se describen en Shimizu et al. (2006) *FEES Journal*, 273, 4133-4140 y también en Chong (2014) *Curr Protoc Mol Biol*. 108:16.30.1-11.

Los métodos de amplificación por PCR se describen, por ejemplo, en Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc. San Diego, Calif, 1990 y Domingues (ed.) *PCR: Methods and Protocols* ISBN 1493970593 (2017). Una reacción de amplificación incluye típicamente el ADN que se va a amplificar, una ADN polimerasa termoestable, dos cebadores de oligonucleótidos, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), tampón de reacción y magnesio. Típicamente, un número deseable de ciclos térmicos se encuentra entre 1 y 25. Los métodos para el diseño de cebadores y la optimización de las condiciones de PCR se encuentran en textos de biología molecular como Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 5ª edición, Wiley, 2002, e Innis et al., *PCR Protocols*, Academic Press, 1990. Los programas informáticos son útiles en el diseño de cebadores con la especificidad requerida y las propiedades de amplificación óptimas (por ejemplo, Oligo Version 5.0 (National Biosciences)). En algunas realizaciones, los cebadores de PCR contienen además sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción del fragmento de ADN amplificado en sitios específicos de enzimas de restricción en un vector. Si se van a añadir sitios de restricción en el extremo 5' de los cebadores de PCR, es preferible incluir unas pocas (por ejemplo, dos o tres) bases 5' adicionales para permitir una escisión más eficiente por la enzima. En algunas realizaciones, los cebadores PCR también contienen un sitio promotor de ARN polimerasa, como T7 o SP6, para permitir la posterior transcripción in vitro. Los métodos para la transcripción in vitro se encuentran en fuentes como Van Gelder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1663-1667, 1990; Eberwine et al., *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3010-3014, 1992.

El peso molecular de un polisacárido o de un conjugado proteína portadora-polisacárido se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con dispersión de luz láser multiángulo (MALS). La configuración SEC MALS-UV-RI consiste en un HPLC 1100 de Agilent (que incluye desgasificador, bomba cuaternaria, automuestreador con control de temperatura, compartimento de columna con control de temperatura y detector de matriz de diodos UV-VIS) en línea con un detector de dispersión de luz láser multiángulo DAWN HELEOS y un interferómetro refractivo diferencial Optilab T-rEX (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) para la detección de las especies que eluyen. A este sistema se acopló la siguiente serie de columnas TSKgel Guard PWXL 6,0 mm ID x 4,0 cm de longitud, 12 µm de partícula; TSKgel 6000 PWXL 7,8 mm ID x 30 cm de longitud, 13 µm de partícula; y una TSKgel 3000 PWXL 7,8 mm ID x 30 cm de longitud, 7µm de partícula. El compartimento de la columna se ajusta a 25°C y el compartimento de la muestra a 4°C. Se usa una fase móvil que consiste en PBS 1x filtrado de 0,2 µm con un 5% v/v de acetonitrilo a un caudal de 0,5 ml/min. Las muestras se inyectan en un intervalo de concentración de 0,2-1,5 mg/ml de polisacárido y el volumen inyectado se ajusta para proporcionar una masa inyectada total de 30-40 µg. Para controlar la HPLC se usa el software Agilent Open Lab y para la recogida y el análisis de datos se usa el software Wyatt Astra 7. La técnica revela la distribución de los pesos moleculares absolutos de los conjugados en una muestra, y los resultados para una población se expresan como un valor medio.

En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares aislados de *S. pneumoniae* se obtienen directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, los métodos divulgados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y en la WO 2008/118752). En otras realizaciones, los polisacáridos capsulares aislados de *S. pneumoniae* se obtienen de una fuente comercial (por

ejemplo, ATCC).

3. Polipéptidos

Los polipéptidos en los conjugados de las composiciones reivindicadas tienen por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y comprenden por lo menos un epítipo activador de células T y por lo menos dos aminoácidos no naturales (nnAA) que son pAMF. En algunas realizaciones, los por lo menos dos residuos de pAMF se sustituyen por residuos nativos del polipéptido. En otras realizaciones, los por lo menos dos residuos de pAMF se añaden antes, se añaden después o se insertan dentro de la secuencia de un polipéptido específico. En realizaciones adicionales, el polipéptido comprende por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, o por lo menos 9 residuos de pAMF. En otra realización, el polipéptido comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de pAMF. En otra realización, el polipéptido comprende 2-9 residuos de pAMF, y preferiblemente 4-6 residuos de pAMF.

En una realización, el pAMF no se encuentra en un epítipo activador de células T de la proteína portadora. En otra realización, el pAMF está sustituido por un residuo de lisina. El antígeno se conjuga con los residuos pAMF.

La proteína portadora puede comprender por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, o por lo menos 9 residuos de pAMF. En una realización, el pAMF está sustituido por un residuo de lisina. En otra realización, el residuo de pAMF se encuentra en una posición que no está en un epítipo activador de células T de la proteína portadora. En otra realización, la sustitución se selecciona del grupo que consiste en K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K265, K386, K523 y K527, y cualquier combinación de los mismos de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, la sustitución comprende una combinación de K25, K213, K245, K265, K386, y K523 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el polipéptido es capaz de generar una respuesta inmunitaria dependiente de células T.

En una realización, no se conjuga ningún antígeno con un residuo de aminoácido natural de la proteína portadora. En otra realización, no se conjuga ningún antígeno con un residuo de lisina de la proteína portadora. En otra realización, el aminoácido con el que se conjuga el antígeno no se encuentra en un epítipo activador de células T de la proteína portadora.

Idealmente, la proteína portadora debería tener una solubilidad de por lo menos 50mg/l (por ejemplo, por lo menos 100mg/l, por lo menos 150mg/l, por lo menos 200mg/l, o por lo menos 250mg/l) cuando se expresa en un sistema de síntesis de proteínas libre de células.

Se prefiere incluir una única especie de nnAA (es decir, el único nnAA en el portador es pAMF). Esto permite usar simultáneamente la misma química de conjugación en cada nnAA. Si se desea unir dos antígenos diferentes con una única molécula portadora, esto puede lograrse usando diferentes especies de nnAA dentro de un único portador y conjugando cada antígeno con un nnAA diferente, pero se prefiere la conjugación con una única especie de nnAA en un portador. Además, se prefiere que cada conjugado incluya la misma especie única de nnAA, es decir, pAMF. Además, se prefiere que cada conjugado incluya la misma proteína portadora.

4. Aminoácidos no naturales

Los residuos de nnAA compatibles con la síntesis de proteínas a base de células o libre de células se describen, por ejemplo, en Schultz et al. Annu Rev Biochem. 2010;79:413-44 particularmente las págs.418-420; y Chin et al. Annu Rev Biochem. 2014;83:5.1-5.30.

El pAMF puede incorporarse durante la traducción (en un sistema celular o uno libre de células) y proporcionar un grupo funcional que no se encuentra en ninguno de los 20 aminoácidos de origen natural. Se conocen varias técnicas para incorporar tales aminoácidos en polipéptidos, véase, por ejemplo, Young & Schultz (2010) J Biol Chem 285:11039-44, Maza et al. (2015) Bioconjugate Chem. 26: 1884-9, y Zimmerman et al. (2014) Bioconjugate Chem. 25:351-61.

El residuo de pAMF comprende un grupo químico adecuado para la reacción química en "click" con un grupo correspondiente en una molécula de antígeno separada o hapteno.

Aminoácidos que contienen azido:

El residuo de pAMF es un nnAA que contiene azido.

Los residuos de nnAA son ácido 2-amino-3-(4-(azidometil)fenil)propanoico (pAMF). El pAMF proporciona una cinética de reacción muy favorable para la producción de conjugados (por ejemplo, mucho más rápida que el uso de ácido 2-amino-3-(4-azidofenil)propanoico (pAF) cuando reacciona con un antígeno de carbohidrato que contiene alquino en un método SPAAC).

La preparación del pAMF se encuentra, por ejemplo, en Stafford et al. US2014-0066598A1, en particular en los párrafos [0331]-[0333]. El proceso implica la sustitución de grupos hidroxilo por cloruro en derivados de los aminoácidos arílicos correspondientes usando cloruro de tionilo, seguido de desplazamiento nucleofílico del cloruro con azida. Aminoácidos adecuados que contienen cadenas laterales de arilo también se adquieren comercialmente.

5. Proteínas portadoras modificadas

En un aspecto, el polipéptido que comprende por lo menos dos residuos de pAMF comprendidos en el conjugado es una versión modificada de una proteína portadora nativa (por ejemplo, eCRM), o un polipéptido que comprende una pluralidad de epítopos activadores de células T de una proteína portadora nativa, en donde el polipéptido tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y comprende por lo menos un epítipo activador de células T.

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de muchas proteínas portadoras nativas están disponibles públicamente. Sin embargo, como se ha indicado, tales proteínas portadoras no modificadas (o nativas) tienen limitaciones, incluyendo la conjugación no discriminadora del antígeno con cualquier aminoácido expuesto en superficie. Como resultado, los epítopos activadores de células T son a menudo sitios donde se produce la conjugación del antígeno. El polipéptido inmunogénico es una proteína portadora modificada por la inclusión de por lo menos dos residuos de pAMF para su uso como sitio de conjugación. Como se ha analizado anteriormente, los residuos de pAMF pueden sustituirse por residuos nativos o añadirse al polipéptido añadiéndolos antes, añadiéndolos después o insertándolos dentro de la secuencia del polipéptido. El uso de aminoácidos no naturales, como se describe en la presente, permite la colocación selectiva de aminoácidos no naturales para la conjugación y, como resultado, pueden evitarse los epítopos activadores de células T de la proteína portadora mejorada en la conjugación de antígenos.

La Tabla 1 muestra las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 1 y 2) de una proteína portadora nativa de ejemplo: CRM197. Los expertos en la técnica reconocerán la adición de una metionina N-terminal a la secuencia de aminoácidos de la CRM197 convencional producida por fermentación de *C. diphtheriae*, y la adición resultante de 1 a la numeración convencional de la posición de los residuos de aminoácidos. La metionina está presente debido a la inclusión de un codón de inicio en el método de síntesis de proteínas libre de células que se usó para producir estos portadores en la presente. La proteína portadora de los conjugados tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la proteína portadora mejorada en los conjugados que comprenden los residuos de nnAA tiene por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

Las proteínas portadoras que tienen identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 (CRM197) incluyen otras proteínas mutantes de toxina diftérica, como la mutante doble K51E/E148K no tóxica que también se ha usado como proteína portadora en conjugados (Pecetta et al. 2016 Vaccine 34: 1405-11). En todas estas variantes de la SEQ ID NO: 1 la toxicidad natural de la toxina diftérica de tipo salvaje está ausente (a través de la mutación G52E en CRM197, o las mutaciones K51E/E148K de Pecetta et al.

Cuando la identidad de secuencia se determina con respecto a la toxina diftérica o tetánica, debe determinarse con respecto a la secuencia de cadena pesada procesada, por ejemplo, con respecto a los aminoácidos 226- 567 de P00588-1, o los aminoácidos 458-1315 de P04958-1 (secuencias UniProt).

En algunas realizaciones, la toxicidad de la proteína portadora mejorada se limita mediante tratamiento con paraformaldehído (o mediante tratamiento con formaldehído o glutaraldehído) seguido de un agente de inactivación. En una realización, la proteína portadora mejorada que comprende los por lo menos dos residuos de pAMF es un polipéptido que tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que comprende una pluralidad de epítopos activadores de células T de CRM197 nativo.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de CRM197 nativo

Aminoácido	>4AE1 B
	MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTUNKYDAAGXS
	VDNENFLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEFLMEQVGTTEEFIKRFGDGASR
	VVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLS
	CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVT
	GTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEEIVAQSIA
	LSLSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLLHDGYAVSWNTV
	EDSIIRTFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCAIDGDV
	TFORPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSSENIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFFEIKS
	(SEQ ID NO: 1)

(continuación)

Ácido nucleico	KU521393. 1 Clon de constructo sintético pUC57-CRM197 toxina CRM197 gen (CRM197), xds completa
5	ATGGGGCGCAGACGATGTTGTGGACTCAAAGTAAATCATTTGTCATGGAAACTTCTCCTCATATCACG
	GCACGAAACCGGGCTACGTTGATAGCATTGAGAAAGGTATCCAAAAACCGAAATCTGGCAGCGAGGG
	TAACTACGATGACGATTGGAAGAATTCTACAGCACCAGACAACAAATATGATGCGGCCGGTTACTCA
	GTGACAACGAAAATCCGCTGTCGGGCAAGCCGGCGGTGTGGTTAAAGTGACGATATCCGGGCCCTGA
10	CCAAAGTCCTGGCCCTGAAAGTGGATAATGCAGAAACCATCAAAAAAGAACTGGGTCTGAGCCTGAC
	GGAACCGCTGATGGAACAGGTTGGCACCAGAAATTTATCAAACGCTTCGGCGATGGTGCCAGTCGT
	GTGCTGCTGTCCCTGCCGTTTCGCAGAGGTAGCTCTAGTGTGGAATATATTAACAATTGGGAACAAG
	CGAAAGCCCTGTCCGTTGAACTGGAAATCAACTTTGAAACCCCGCGGCAACGTTGTCAGGATGCGAT
	GTATGAATACATGGCACAAGCTTGCGCGGGTAATCGCGTTTCGTCGCAGCGTCGGCTCCTCACTGTCT
15	TGTATCAACCTGGACTGGGATGTTATCCGTGATAAAACCAAAACGAAATCGAAAGTCTGAAAGAAC
	ATGGCCCCGATCAAAAAACAAATGAGCGAATCTCCGAATAAAACGGTGTCCGAAGAAAAAGCTAAACA
	GTATCTGGAAGAATTCCACCAACCGCACTGGAACATCCGGAACGTGTCAGAACTGAAACCGTGACG
	GGTACCAACCCGGTTTTTTCGGGCGCAAAATTACGCAGCTTGGGCTGTGAACGTTGCGCAAGTGATTG
	ACTCGGAACCGGCGGATAATCTGGAAAAACACGGCGGCGCTGAGTATTCTGCCGGGCATCGGTTTC
20	CGTTATGGGTATTGCCGACGGCGCAGTCCATCACAAACACCGAAGAAATTGTGGCCAGTCTATCGCA
	CTGTGAGCCTGATGGTTGCTCAAGCGATTCCGCTGGTTGGCGAACTGGTTGATATCGGCTTTGCAG
	CTTACAACCTTCGTGGAAGTATTATCAACCTGTTTCAGGTTGTCCACAACCTCATATAATCGCCCGGC
	CTACTCGCCGGGTACAAAACCCCAACCGTTCTGTCATGACGGCTACGCGGTTAGCTGGAATACGGTC
	GAAGATTCTATTATCCGTACCGGCTTTTCAGGTTGAATCTGGCCACGACATTAAAATCACGGCTGAAA
25	ACACCCCGCTGCCGATTGCAGGTGTTCTGCTGCCGACGATCCCGGGTAACTGGATGTTAACAAATC
	AAAAACCCATATCTCGGTCAACGGTCGCAAAATTCGTATGCGCTGCCGTGCGATCGACGGCGATGTG
	ACCTTCTGCTCGTCCGAAAGCCCGGTTCTATGTGGGCAACGGTGTCCATGCTAATCTGCACGTGGCGT
	TTTCATCGCTCTAGTTCCGAAAAATCCATAGTAACGAAATCTCATCGGATTCCATTGGTGTGCTGGG
30	CTACCAGAAAACCGTGGACCATACCAAGTGAATAGCAAACCTGAGCCTGTTCTTCGAAATCAAATCG
	TAA (SEQ ID NO:2)

5a. CRM197 que contiene nnAA

Como se ha mencionado anteriormente, la Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de CRM197. CRM197 ("material de reacción cruzada 197"; también conocido como CRM₁₉₇) es un mutante no tóxico de la toxina diftérica que se usa en muchas vacunas glicoconjugadas aprobadas (por ejemplo, véase Broker et al. (2011) Biologicals 39: 195-204). Las proteínas portadoras para su uso con la invención tienen por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la proteína portadora puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 excepto por la presencia de dos o más residuos de pAMF (que pueden insertarse dentro de la SEQ ID NO: 1 o pueden sustituirse por uno o más residuos de aminoácidos dentro de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, sustituirse por Lys y/o Phe).

En algunas realizaciones, se sustituye por lo menos un residuo de Lys y/o por lo menos un residuo de Phe en la SEQ ID NO: 1 por un residuo pAMF. Se prefiere sustituir más de un residuo en la SEQ ID NO: 1 con pAMF e, idealmente, se sustituye por pAMF sólo una especie de residuo en SEQ ID NO: 1, por ejemplo, sólo se sustituyen residuos de Lys. Cuando se sustituye más de un residuo en la SEQ ID NO: 1 por un nnAA se prefiere que en cada posición de sustitución se use pAMF.

Se prefieren las proteínas portadoras con 2-9 residuos de pAMF dentro de la SEQ ID NO: 1, e idealmente con 4-9, 4-8, o 4-6 residuos de pAMF, por ejemplo 4, 5 o 6 residuos de pAMF. Esto permite una unión más extensa de los antígenos al portador que el uso de un único nnAA, aumentando de este modo la relación antígeno: portador, a la vez que se evita una alteración excesiva de la secuencia y la estructura nativas, que puede dar como resultado insolubilidad.

Los estudios de CRM197 han identificado epítomos de células T dentro de los residuos P272-D291, V322-G384, y Q412-I458. Por lo tanto, se prefiere evitar la introducción de nnAA dentro de estas regiones de la SEQ ID NO: 1. Estas regiones incluyen F274, F356, F361, F369, K420, K441, K446, K448 y K457, por lo que estos son los residuos de Phe y Lys menos preferidos para la sustitución de nnAA en CRM197. Los residuos de Lys preferidos para la sustitución por un nnAA en la SEQ ID NO: 1 son K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, o K527. Otros residuos de Lys útiles para la sustitución por un nnAA son K11, K38, K83, K104, K105, K126, K158, K173, K222, K237, K243, K475 y K499. Los residuos de Phe preferidos para la sustitución por un nnAA son F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 o F532.

Los estudios estructurales de CRM197 revelan dos regiones 3D generales: la primera región discurre desde

el extremo N-terminal hasta Asn-374; y la segunda región discurre desde Ser-375 hasta el extremo C-terminal. Idealmente, un portador usado en la composición reivindicada incluye por lo menos un nnAA en la primera región y por lo menos un nnAA en la segunda región, por ejemplo, por lo menos 2 nnAA en cada región, o por lo menos 3 nnAA en cada región, en donde el portador comprende por lo menos dos residuos de pAMF. Esto permite que los antígenos conjugados se separen espacialmente cuando se unen al portador. Es útil un portador con 3 nnAA en la primera región y 3 nnAA en la segunda región, en donde el portador comprende por lo menos dos residuos de pAMF.

La primera región contiene 27 residuos de Lys, y la segunda región contiene 12 residuos de Lys. Por tanto, uno o más (por ejemplo, 3) residuos de Lys dentro de los 374 aminoácidos N-terminales y uno o más (por ejemplo, 3) residuos de Lys dentro de los 162 aminoácidos C-terminales de la SEQ ID NO: 1 pueden sustituirse con un nnAA, por ejemplo, con pAMF.

Las realizaciones preferidas de portadores que contienen nnAA basados en CRM197 tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en la que uno o más de los residuos K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, y/o K527 son sustituidos por un nnAA, en donde el portador comprende por lo menos dos residuos de pAMF. Una de tales secuencias es la SEQ ID NO:9, en la que cada X representa un nnAA (preferiblemente el mismo nnAA, como pAMF), y en donde el portador comprende por lo menos dos residuos de pAMF:

```
MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAG
YSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGD
GASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKGQDAMYEYMAQACAGNRVRRS
VGSSLSCINLWDVIRDXTTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPE
LSELXTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHN
TEEIVAQSIALLSSLMVAQAIFLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPF
LHDGYAVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNG
RKIRMRCRAIDGDTVFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVD
HTKVNSXLSLFFFIKS (SEQ ID NO: 9)
```

Se ha descubierto que esta proteína portadora se expresa muy bien en un sistema de síntesis de proteínas libre de células, a la vez que conserva una buena solubilidad y proporciona buenas respuestas inmunogénicas cuando se conjuga con polisacáridos capsulares neumocócicos.

Se proporciona una composición que incluye múltiples conjugados diferentes de acuerdo con las reivindicaciones, en la que cada conjugado incluye una proteína portadora que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 (idealmente en la que cada residuo X es el mismo nnAA, preferiblemente pAMF), en donde el portador comprende por lo menos dos residuos de pAMF.

La SEQ ID NO: 1 tiene una metionina en el extremo N-terminal (que típicamente estará formilada) que no está presente en CRM197 de tipo salvaje pero que se incluye para iniciar la traducción sin requerir la secuencia líder nativa completa. En algunas realizaciones, la proteína portadora usada en la presente carece de una metionina en el extremo N-terminal, por ejemplo, puede estar ausente la metionina en el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO:9. En algunas realizaciones, una proteína portadora a base de CRM197 no incluye aminoácidos naturales (y, más preferiblemente, ningún aminoácido) en sentido ascendente del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 o en sentido descendente del extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 1.

Estas proteínas portadoras de CRM197 que contienen nnAA son particularmente útiles para conjugarlas con polisacáridos capsulares neumocócicos. Estos conjugados pueden combinarse para formar composiciones multivalentes, como se analiza en otras partes de la presente.

Cuando se usan para preparar conjugados los portadores de CRM197 que contienen nnAA están típicamente presentes en forma monomérica, en lugar de asociarse con otras subunidades de CRM197 para formar multímeros de CRM197.

6. Métodos de producción de proteínas portadoras

Métodos generales para la producción de polipéptidos:

La proteína portadora mejorada en el conjugado puede producirse mediante cualquier método descrito para la producción de polipéptidos. Los métodos adecuados para la producción de polipéptidos incluyen, entre otros, la síntesis química de péptidos en fase sólida, la expresión de proteínas recombinantes a base de células (en *E. coli* o en un huésped nativo) y la expresión de proteínas libres de células, así como cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, la ligadura de proteínas expresadas usando una combinación de componentes peptídicos sintéticos y recombinantes).

La proteína portadora de pAMF mejorada en el conjugado puede producirse mediante un método que comprende la "reasignación de codones". La pAMF se carga en su ARNt correspondiente usando aminoacil-ARNt sintetetasas de tipo salvaje, y la pAMF sustituye por completo uno de los 20 aminoácidos canónicos especificados en una secuencia de ADN plantilla. Para evitar la interferencia del aminoácido nativo, esto requiere generalmente el uso de una cepa de expresión bacteriana que sea auxotrófica para el aminoácido nativo que se está sustituyendo. Esta estrategia es más específica del aminoácido que del residuo, ya que se sustituyen con la pAMF todos los residuos AA de un cierto tipo.

La proteína portadora de pAMF mejorada en el conjugado puede producirse mediante una estrategia que comprende la "supresión sin sentido". En este enfoque, el aminoácido no natural se especifica en una secuencia de ADN molde mediante un codón raro o "sin sentido" que normalmente no especifica un aminoácido en la naturaleza. Schultz (Noren et al. Science. 1989(244):182-188.) y Chamberlin (Bain et al. J Am Chem Soc. 1989(111):8013-8014.) han sido pioneros en una variación del método de supresión de codones sin sentido, e implica el uso del codón de parada raro TAG (el codón "ámbar"; UAG en el código del ARN) junto con su ARNt y su aminoacil-ARNt sintetasa (aaRS) correspondiente para incorporar los nnAA en un polipéptido de manera específica del sitio.

El enfoque de "supresión sin sentido" puede implicar aislar un par ARNt/aaRS, modificar el ARNt en el giro anticodón para que reconozca un codón ortogonal (por ejemplo, el codón ámbar TAG, el codón ópalo TGA, u otro codón o secuencia de bases que no se use habitualmente para especificar aminoácidos en la traducción), y modificar el aaRS para que prefiera el nnAA al aminoácido nativo de aminoacil-ARNt. El par ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa puede provenir del mismo organismo que la maquinaria de traducción usada para la síntesis del polipéptido. El par ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa puede ser de una especie diferente a la maquinaria de traducción usada para la síntesis del polipéptido. Se han descrito métodos para modificar el giro anticodón del ARNt y el sitio activo de aaRS, así como ejemplos de pares ARNt/aaRS ortogonales manipulados.

Alternativamente, en el enfoque de "supresión sin sentido", la producción de la proteína portadora mejorada no implica el uso de una aminoacil-ARNt sintetasa manipulada. En este caso, se aísla un ARNt ortogonal solo y se modifica en el giro anticodón para reconocer un codón ortogonal (por ejemplo, el codón ámbar TAG, u otro codón o secuencia de bases que no se usa habitualmente para especificar aminoácidos en la traducción). El ARNt ortogonal manipulado se acila luego in vitro mediante un método químico adecuado (por ejemplo, el método de Heckler et al. Biochemistry. 27 de marzo de 1984;23(7): 1468-73. que implica el uso de ARN ligasa T4 y tARNPhe mutante), y suplementado en un extracto de síntesis de proteínas libre de células. Como esta realización usa ARNt químicamente acilados, sólo es compatible con métodos de síntesis de proteínas que estén libres de células.

Síntesis de proteínas libre de células:

Una técnica particularmente útil para producir proteínas portadoras que contienen nnAA es usar síntesis de proteínas libre de células. En la técnica se conocen varias técnicas de expresión de proteínas libre de células y de esta manera pueden incorporarse varios nnAA (por ejemplo, véase la Tabla I de Quast et al. (2015) FEES Letters 589: 1703-12) a la vez que se evitan los potenciales efectos citotóxicos de los nnAA. En algunas realizaciones, la proteína portadora mejorada se produce mediante síntesis de proteínas a base de extracto libre de células. En algunas realizaciones, el extracto libre de células comprende un extracto de reticulocitos de conejo, germen de trigo o *E. coli*. En realizaciones adicionales, el extracto libre de células se suplementa con aminoácidos, fuentes de energía, sistemas de regeneración de energía o cofactores de cationes, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el extracto comprende ARNt mutante o aaRS mutante (aminoacil ARNt sintetasa) suplementados exógenamente, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el extracto comprende lisados de cepas de *E. coli* que codifican genéticamente ARNt mutante o aaRS mutante, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las cepas de *E. coli* usadas para los lisados son cepas atenuadas de RF-1. Se han descrito sistemas de síntesis de proteínas libres de células compatibles para la inserción de pAMF en polipéptidos recombinantes (por ejemplo, en el documento US20160257946A1).

El documento US20160257946A1 demuestra: (a) cómo la tirosina-sintetasa de *Methanococcus jannaschii* anterior se adapta usando mutagénesis de tal manera que cargue preferentemente p-azidometil-L fenilalanina (pAMF) en un ARNt que reconoce ámbar, y (b) cómo se usa un sistema de síntesis libre de células que comprende el par sintetasa/ARNt modificado para incorporar selectivamente pAMF en anticuerpos como el trastuzumab.

Los polipéptidos para los conjugados pueden producirse usando métodos de producción de polipéptidos en un extracto libre de células que contenga 2 o más aminoácidos no naturales. Los polipéptidos también pueden tener una actividad biológica comparable a la de la proteína nativa, o los polipéptidos pueden tener una actividad biológica mejorada o potenciada comparable a la de la proteína nativa.

Opcionalmente, la actividad específica de una proteína en una composición se determina determinando el nivel de actividad en un ensayo funcional, cuantificando la cantidad de proteína presente en un ensayo no funcional (por ejemplo, inmunotinción, ELISA, cuantificación en gel teñido con coomassie o plata, etc.) y determinando la

proporción de proteína biológicamente activa o proteína no agregada con respecto a la proteína total. Generalmente, la actividad específica definida de esta manera será de por lo menos aproximadamente un 5% de la proteína nativa, habitualmente de por lo menos aproximadamente un 10% de la proteína nativa, y opcionalmente de aproximadamente un 20%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 60% o más.

Los métodos para producir los polipéptidos que contienen pAMF para los conjugados pueden implicar alterar las concentraciones de ARNt específico de pAMF, sintetasa específica de pAMF, el propio pAMF o la temperatura de traducción, y cualquier combinación de los mismos. Tales condiciones permiten opcionalmente menos errores de traducción, una velocidad de incorporación del pAMF mejorada, actividad mejorada de las chaperonas necesarias para el plegamiento de proteínas con la incorporación de pAMF, actividad disminuida de factores celulares que interfieren con la incorporación del pAMF, o cualquier combinación de los mecanismos anteriormente mencionados.

En los métodos de producción del polipéptido mejorado para los conjugados, la concentración de ARNt específico de pAMF puede aumentarse a una concentración superior a aproximadamente 20 μ M, lo que lleva a una fracción aumentada de polipéptido soluble o activo. La concentración de ARNt puede aumentarse mientras que la concentración de pAMF se mantiene por debajo de aproximadamente 2 mM y la pAMF sintetasa se mantiene por debajo de aproximadamente 5 μ M.

La temperatura de incubación de la mezcla de traducción puede estar entre 20 y 30 grados Celsius, aproximadamente 20 grados Celsius, o por debajo de 20 grados Celsius. En algunas variaciones, estas modificaciones de temperatura se combinan independientemente con modificaciones de las concentraciones de ARNt específico de pAMF, concentraciones de pAMF o concentraciones de pAMF sintetasa descritas en el párrafo anterior.

7. Variantes de secuencia

En algunas realizaciones, las proteínas portadoras mejoradas de los conjugados comprenden dos o más residuos de pAMF sustituidos en cualquier posición dentro del polipéptido siempre que se conserve la función inmunogénica de uno o más epítomos de células T del polipéptido. Cuando la proteína portadora mejorada se basa en un portador conocido, habitualmente se prefiere sustituir algunos o todos los nnAA por aminoácidos de origen natural existentes en el portador conocido para minimizar la posibilidad de afectar negativamente a las propiedades del portador. Se aprecia, sin embargo, que los nnAA pueden insertarse internamente o en una terminación como adiciones a la secuencia portadora de partida. En algunas realizaciones, los por lo menos dos residuos de pAMF en la proteína portadora mejorada usada en los conjugados no están presentes dentro de una o más regiones de la proteína que comprenden un epítomo de células T. En otra realización, ningún nnAA en el polipéptido inmunogénico mejorado está presente dentro de una o más regiones de la proteína que comprenden un epítomo de células T.

En algunas realizaciones, los residuos de pAMF se sustituyen por uno o más de los veinte aminoácidos codificados de manera natural, incluyendo alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En algunas otras realizaciones, los residuos de pAMF se sustituyen por uno o más de una clase específica de residuo de aminoácido natural, como alifático, aromático, ácido, básico, hidroxílico, que contiene azufre o amídico (que contiene un grupo amida). En algunos casos, sólo se sustituye un aminoácido específico (por ejemplo, lisina) por residuos de pAMF dentro del polipéptido en una o más posiciones. En otros casos, se sustituyen dos o más aminoácidos diferentes (por ejemplo, lisina, fenilalanina, etc.) por pAMF dentro del polipéptido en dos o más posiciones. Para la sustitución por nnAA se prefieren la lisina y la fenilalanina porque (i) la lisina se ha usado a menudo para la conjugación con proteínas portadoras existentes, por lo que el portador que contiene nnAA puede mantener los mismos sitios de unión y (ii) muchos nnAA útiles se basan en la fenilalanina, por lo que el portador con nnAA puede tener una modificación estructural mínima en comparación con una secuencia nativa. Se prefieren los polipéptidos en los que sólo se sustituye una única especie de aminoácido por pAMF, por ejemplo, en los que sólo se sustituyen los residuos de Lys.

En algunas realizaciones, los residuos de pAMF se sustituyen por al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15 residuos de aminoácidos naturales de una proteína portadora. En algunas realizaciones, el residuo de nnAA se sustituye por al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15 residuos de aminoácidos naturales de una proteína portadora. En algunas realizaciones, el residuo de nnAA se sustituye por al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15 residuos de aminoácidos naturales de la SEQ ID NO: 1.

En aspectos adicionales, el pAMF se sustituye por uno o más residuos de aminoácidos dentro de una proteína portadora. El residuo de aminoácido específico que se selecciona para crear variantes de pAMF sustituidas múltiples descritas en la presente puede determinarse dividiendo la proteína en subdominios y eligiendo para la sustitución un único aminoácido o conjuntos de residuos de aminoácidos que no se obstruyan estéricamente entre sí (por ejemplo,

de tal manera que haya una distancia multiangstrom entre los sitios de sustitución). A continuación, se analiza la división de CRM197 en dos regiones estructurales.

En algunas realizaciones, el pAMF se sustituye por un residuo de aminoácido cargado. Por tanto, un residuo de pAMF puede sustituirse por un residuo de aminoácido aspartato, glutamato, lisina, arginina o histidina. En algunas realizaciones, el pAMF se sustituye por un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo, por un residuo de aspartato o glutamato. En algunas realizaciones, el pAMF se sustituye por un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo, por un residuo de lisina, arginina o histidina.

En algunas realizaciones, el pAMF se sustituye por uno o más residuos de lisina dentro de un polipéptido inmunogénico. Por ejemplo, una versión mejorada de la SEQ ID NO: 1 se genera sustituyendo pAMF por lisina de la siguiente manera: 1) un residuo del grupo que consiste en K25, K34, K38 y K40; 2) un residuo seleccionado del grupo que consiste en K213 y K215; y 3) de 2 a 4 residuos seleccionados del grupo que consiste en K228, K245, K265, K386, K523 y K527. En otras realizaciones más, las una o más clases específicas del residuo de aminoácido natural sustituido se seleccionan del grupo que consiste en K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K265, K386, K523 y K527, y cualquier combinación de los mismos de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la sustitución de pAMF en la SEQ ID NO: 1 se selecciona de uno o más de K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 y K527. En una realización, la sustitución de pAMF comprende seis residuos que consisten en K25, K215, K228, K265, K386 y K523 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la sustitución de pAMF en la SEQ ID NO: 1 comprende K265. En otras realizaciones, la sustitución de pAMF en la SEQ ID NO: 1 comprende K386. En otra realización, las sustituciones de pAMF en la SEQ ID NO: 1 comprenden K265 y K386. En una realización adicional, el pAMF está sustituido por una fenilalanina. Las fenilalaninas preferidas para la sustitución incluyen F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531, o F532 de la SEQ ID NO: 1. Debido a su proximidad, generalmente se prefiere no sustituir tanto en F531 como en F532.

Los epítomos de unión para las células CD4⁺ humanas en la toxina diftérica que son reconocidos por la mayoría de los sujetos analizados abarcan los residuos 271-290, 321-340, 331-350, 351-370, 411-430, o 431-450 (véase, Raju et al., Eur J Immunol. Diciembre de 1995;25(12):3207-14). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los dos o más pAMF sustituidos no se encuentran dentro de los residuos 271-290, 321-340, 331-350, 351-370, 411-430, y/o 431-450 de la SEQ ID NO: 1. En una realización, los dos o más pAMF sustituidos no se encuentran dentro de los residuos 331-350 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, los dos o más pAMF sustituidos no se encuentran dentro de los residuos 331-350 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, los dos o más pAMF sustituidos no se encuentran dentro de los residuos 321-340 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización más, los dos o más pAMF sustituidos no se encuentran dentro de los residuos 431-450 de la SEQ ID NO: 1.

8. Epítomos de células T

Los epítomos de células T de una proteína portadora pueden determinarse mediante cualquier método conocido. Como ayuda en el diseño de proteínas portadoras mejoradas de la presente divulgación, los epítomos de unión a células T en proteínas se predicen usando algoritmos que tienen en cuenta varios factores, como perfiles de anfipaticidad de proteínas, motivos de secuencia, matrices cuantitativas (QM), redes neuronales artificiales (ANN), máquinas de vectores de soporte (SVM), relación de actividad de estructura cuantitativa (QSAR) y simulaciones de acoplamiento molecular, etc. (véase, Desai et al. Methods Mol Biol. 2014;1184:333-64). Por ejemplo, los epítomos de unión a células T en la toxina diftérica/CRM se han predicho usando el algoritmo de DeLisi & Berzofsky (véase, Bixler et al. WO89/06974 y PNAS 82:7848, 1985). Los epítomos de células T predichos pueden confirmarse experimentalmente. Por ejemplo, los epítomos de células T de un polipéptido inmunogénico de interés pueden determinarse experimentalmente sintetizando fragmentos peptídicos parcialmente solapados correspondientes a la secuencia completa del polipéptido inmunogénico (o regiones predichas) y realizando ensayos de proliferación de líneas celulares CD4⁺ (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC)) en presencia de cada fragmento. Este enfoque general se ha empleado para mapear los epítomos de células T en la toxina diftérica (Raju et al., Eur J Immunol. Diciembre de 1995;25(12):3207-14), toxina tetánica (Diethelm-Okita et al., J Infect Dis. Febrero de 1997;175(2):382-91), proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis* (OMP) (J Exp Med. 1 de julio de 1992; 176(1): 79-88), y BB, una proteína portadora derivada de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus* (Goetsch et al., Clin Diagn Lab Immunol. Enero 2003; 10(1):125-32). También pueden cribarse directamente las proteínas portadoras mejoradas de la presente divulgación para la proliferación de células CD4⁺ y/o una respuesta de citoquinas para establecer la presencia de un epítomo de células T que no haya sido inactivado por la presencia de uno o más nnAA.

9. Métodos de producción de conjugados

Los conjugados para las composiciones pueden producirse usando un método para la síntesis de un polipéptido que comprende por lo menos dos residuos de pAMF en una mezcla de expresión libre de células mantenida a una temperatura entre aproximadamente 10 grados Celsius y aproximadamente 30 grados Celsius. La temperatura puede estar por encima de aproximadamente 20 grados Celsius. La temperatura puede estar por debajo de aproximadamente 20 grados Celsius. La temperatura puede estar entre aproximadamente 14 grados Celsius y

aproximadamente 18 grados Celsius. El polipéptido puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende un codón de supresión. La mezcla de expresión libre de células puede comprender un par ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal específico para el nnAA. La concentración de ARNt puede ser de por lo menos 20 μ M. La concentración de nnAA puede ser menor de aproximadamente 2 mM y la concentración de la aminoacil-ARNt sintetasa puede ser menor de aproximadamente 5 μ M. El método puede comprender conjugar el polipéptido con una fracción activa. La fracción activa puede seleccionarse del grupo que consiste en un hapteno, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico, un glicano derivado de tumor, una toxina peptídica, un macrófido, un poliéter y cualquier combinación de los mismos. El polipéptido puede seleccionarse del grupo que consiste en una hormona de crecimiento, un factor de coagulación, una proteína plasmática, una interleucina, un dominio extracelular de receptor de células T, un dominio extracelular de factor de crecimiento, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico y cualquier combinación de los mismos. La mezcla de expresión puede comprender un extracto celular de *E. coli*, germen de trigo o reticulocito de conejo. La mezcla de expresión puede comprender por lo menos un 30% de extracto celular. El polipéptido puede comprender por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, o por lo menos 9 residuos de pAMF. El polipéptido producido puede comprender tanto una fracción soluble como una insoluble, en donde la proporción entre la fracción soluble y la insoluble es de por lo menos el 40% (p/p). El polipéptido producido puede comprender tanto una fracción soluble como una insoluble, en donde la proporción entre la fracción soluble y la fracción insoluble es de por lo menos el 60% (p/p). El polipéptido producido por expresión libre de células puede comprender por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, o por lo menos 9 nnAA y la proporción de la fracción soluble con la fracción insoluble puede ser por lo menos del 20% (p/p), por lo menos del 30% (p/p), por lo menos del 40% (p/p), por lo menos del 50% (p/p), 60% (p/p), por lo menos del 70% (p/p), por lo menos del 80% (p/p), por lo menos del 90% (p/p).

Antígenos:

Polisacáridos derivados de bacterias: Los polisacáridos capsulares derivados de bacterias son polímeros de alta masa molecular de bacterias grampositivas o gramnegativas que protegen a los microorganismos frente a las respuestas inmunitarias y, como tales, representan dianas atractivas para las vacunas cuando el objetivo es la producción de anticuerpos neutralizantes. Tales polisacáridos capsulares se preparan generalmente a partir de lisados de células completas o sobrenadantes de cultivo de la bacteria correspondiente mediante procesos que implican diafiltración, eliminación de proteínas, precipitación con etanol, eliminación de ácidos nucleicos y secado por congelación. Los ejemplos incluyen, entre otros, el protocolo Merieux (Institut Merieux (1980) Brevet Belge 80:26320) y el protocolo Yavordios (Yavordios et al. EP0071515A1 (1983)).

Polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*: El antígeno en el conjugado es un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae*, en donde el polisacárido capsular en cada conjugado proteína portadora-antígeno distinto es de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae*, y en donde hay un conjugado proteína portadora-antígeno distinto para cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F de *Streptococcus pneumoniae*. La *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva encapsulada que puede provocar neumonía, bacteriemia y meningitis. Hay 90 serotipos distintos documentados de *S. pneumoniae* (descritos, por ejemplo, en Kalin, M. Thorax 1998;53: 159-162) que portan polisacáridos capsulares con estructuras de unidades de repetición específicas del serotipo. Por lo tanto, en algunos casos el antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado entre 1, 2, 3, 4, S, 6A, 6B, 7F, 7A, 7B, 7C, 8, 9A, 9L, 9N, 9V, 10F, 10A, 10B, 10C, 11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 12F, 12A, 12B, 13, 14, 15F, 15A, 15B, 15C, 16F, 16A, 17F, 17A, 18F, 18A, 18B, 18C, 19F, 19A, 19B, 19C, 20, 21, 22F, 22A, 23F, 23A, 23B, 24F, 24A, 24B, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33F, 33A, 33B, 33C, 33D, 34, 35F, 35A, 35B, 35C, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A, y 48 (Henrichsen J Clin Microbiol 199S; 33:27S9- 2762). Sin embargo, sólo un subconjunto de estos serotipos es comúnmente responsable de la infección bacteriana, que incluye los serotipos 1, 2, 3, 4, S, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 y 33F. Los serotipos 6C, 7C, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 31, 34, 35B, 35F, 37 y 38 también se han convertido en motivo de preocupación clínica, al igual que los serotipos 20A, 20B y 24B. En otra realización, el antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado entre los serotipos 1, 2, 3, 4, S, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 y 33F. En otra realización, el antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado entre los serotipos 6C, 7C, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 31, 34, 35B, 35F, 37 y 38. Las realizaciones descritas en la presente también pueden comprender adicionalmente uno o más polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados entre los serotipos 20A, 20B y 24B.

Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de la invención incluyen conjugados de polisacárido capsular de por lo menos 20, 21, 24 o 25, serotipos neumocócicos diferentes, en donde hay un conjugado proteína portadora-antígeno distinto para cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *Streptococcus pneumoniae*. Además de estos serotipos una composición incluye preferiblemente uno o más de los serotipos 2, 9N, 17F y/o 20. Alternativamente, además de los serotipos especificados en la reivindicación 1, una composición incluye preferiblemente uno o más serotipos 2, 6C, 9N, 15A, 15C, 16F, 17F, 20, 20A, 20B, 23A, 23B, 24F, 24B, 31, 34, 35B, 35F y 38. Una combinación útil de 15 o más (por ejemplo, 16 o más) serotipos que se describe en la presente pero no se reivindica incluye cada uno de los serotipos 1, 3, 4, S, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, y puede incluir también el serotipo 8. Una combinación útil de 24 o más

serotipos incluye cada uno de los serotipos 1, 2, 3, 4, S, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.

Las estructuras de las unidades de repetición de polisacáridos capsulares comunes del serotipo de *S. pneumoniae* se describen en Jones et al. (Jones C et al. An Acad Bras Cienc. 200S Jun;77(2):293-324):

Tipo 1

[→3)-D-AAT-α-Galp-(1→4)-α-D-GalpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-GalpA-(1→]

Tipo 2

[→4)-β-D-Glcp-(1→3)-[α-D-GlcpA-(1→6)-α-D-Glcp-(1→2)]-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)β-L-Rhap-(1→]

Tipo 3

[→3)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→]

Tipo 4

[→3)-β-D-ManpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→4)-α-D-Galp2,3(S)Py-(1→]

Tipo 5

[→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-L-PnepNAc-(1→2)-β-D-GlcpA-(1→3)]-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-Sugp-(1→]

Tipo 6B

[→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→4)-D-Rib-ol-(5→P→]

Tipo 9N

[→4)-α-D-GlcpA-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-β-D-ManpNAc-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-α-D-GlcpNAc-(1→]

Tipo 9V

[→4)-α-D-GlcpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-ManpNAc(4/6OAc)-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→]

Tipo 12F

[→4)-[α-D-Galp-(1→3)]α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→4)-[α-D-Glc-(1→2) -α-D-Glc-(1→3)]-3-D-ManNAcA-(→]

Tipo 14

[→4)-β-D-Glcp-(1→6)-[β-D-Galp-(1→4)]-β-D-GlcpNAc-(1→3)-β-D-Galp-(1→]

Tipo 18C

[→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-D-Glcp(6OAc) (1→2)][Gro-(1→P→3)]-β-D-Galp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→3)-β-L-Rhap-(1→]

Tipo 19F

[→4)-β-D-ManpNAc-(1→4)-α-D-Glcp-(1→2)-α-L-Rhap-(1→P→]

Tipo 23F

[→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-L-Rhap-(1→2)]-[Gro-(2→P→3)]-β-D-Galp-(1→4)-β-L-Rhap-(1→]

Un análisis más exhaustivo de los polisacáridos se encuentra en Geno et al. (2015) Clin. Microbiol. Rev. 28:871-99, en el que la Tabla 1 muestra las estructuras de 97 serotipos conocidos. Esta tabla también divulga la proporción de residuos de sacáridos que se acetilan cuando la acetilación no es completa.

El polisacárido capsular está opcionalmente O-acetilado. En algunas realizaciones, el polisacárido capsular de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 y 33F comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre un 10-100%, entre un 20-100%, entre un 30-100%, entre un 40-100%, entre un 50-100%, entre un 60-100%, entre un 70-100%, entre un 75-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% u 80-90%. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es mayor del 10%, mayor del 20%, mayor del 30%, mayor del 40%, mayor del 50%, mayor del 60%, mayor del 70%, mayor del 80%, mayor del 90% o de aproximadamente el 100%. El grado de O-acetilación del polisacárido puede determinarse, por ejemplo, mediante NMR de protones (véase, por ejemplo, Lemerminier & Jones (1996) Carbohydrate Research 296:83-96; Jones et al. (2002) J Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30: 1233-1247). En algunas realizaciones, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante un análisis ion-HPLC. Normalmente, el polisacárido de un conjugado conservará los niveles de O-acetilación observados en el polisacárido de partida purificado a partir de una bacteria.

En una realización, el polisacárido capsular de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31, y 33F tiene un peso molecular de entre 10kDa y

4.000 kDa. En otras de tales realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 4.000 kDa. En otras de tales realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.400 kDa. En realizaciones adicionales, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 3.500 kDa; entre 50 kDa y 3.000 kDa; entre 50 kDa y 2.500 kDa; entre 50 kDa y 2.000 kDa; 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 4.000 kDa; entre 100 kDa y 3.500 kDa; entre 100 kDa y 3.000 kDa; entre 100 kDa y 2.500 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 4.000 kDa; entre 200 kDa y 3.500 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 2.500 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. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los interiores anteriores se contempla como una realización de la divulgación.

El polisacárido capsular está opcionalmente modificado químicamente con respecto al polisacárido capsular que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el polisacárido está opcionalmente des-O-acetilado (parcial o completamente), des-N-acetilado (parcial o completamente), N-propionato (parcial o completamente), etc. La desacetilación se produce opcionalmente antes, durante o después de la conjugación con un asa química o polipéptido, pero típicamente se produce antes de la conjugación.

Métodos de derivatización y preparación de antígenos y composiciones resultantes de los mismos:

Los antígenos para los conjugados pueden contener un asa química capaz de reaccionar con un grupo correspondiente introducido en un residuo de pAMF del polipéptido como se ha descrito anteriormente en la presente. El asa química puede comprender un grupo adecuado para la reacción química en "clic" con un grupo correspondiente en un polipéptido.

El asa química puede introducirse mediante un proceso general que comprende 3 pasos: (a) activar el antígeno; (b) opcionalmente, hacer reaccionar el antígeno con un conector o grupo nucleófilo para introducir reactividad no presente normalmente en el antígeno; y (c) conjugar el antígeno con el asa química. Dos o más de los pasos (a)-(c) pueden ser simultáneos, como en el caso en que un asa química se modifica mediante la adición de una fracción reactiva como la N-hidroxisuccinimida. Dos o más de los pasos (a)-(c) pueden ser discretos, con purificación opcional del antígeno entre los pasos. El paso (a) puede comprender adicionalmente un paso para eliminar un grupo bloqueante en el antígeno, de tal manera que sean más accesibles a la activación ciertos grupos funcionales (por ejemplo, hidroxilos, aminas, tioles).

El asa química puede introducirse en localizaciones variables con respecto al antígeno. El asa química puede introducirse en un extremo terminal (por ejemplo, los extremos reductor y no reductor de un polisacárido, los extremos N- y C-terminales de un polipéptido, o el extremo de la cadena acilo de un glicérido). El asa química puede introducirse en una localización interna (por ejemplo, un aminoácido interno de un polipéptido, o un hidroxilo, amina o hidroxilo activado interno de un polisacárido). El asa química puede introducirse en uno o más extremos terminales, además de en una localización interna. El método particular de activación usado para el antígeno afectará a las localizaciones activadas para la conjugación y, por tanto, a la localización final del asa química conjugada en el antígeno. Se prefiere introducir múltiples asas químicas en un antígeno de tal manera que pueda lograr múltiples enlaces con portadores.

El polipéptido puede conjugarse con el antígeno mediante asas químicas de la siguiente manera. Un antígeno se activa para incorporar por lo menos una primera asa química en el mismo, donde la primera asa química es capaz de conjugarse con una segunda asa química de un residuo de pAMF en el polipéptido. El antígeno activado se combina con un polipéptido que contiene por lo menos dos residuos de pAMF que llevan la segunda asa en condiciones en las que la primera y la segunda asas químicas reaccionan para formar un conjugado antígeno-polipéptido. La reacción así habilitada es una reacción de bioconjugación covalente no catalítica. Los sitios reactivos en el antígeno que sirven como "primer asa química" son preferiblemente grupos alquínico, donde los grupos alquínico pueden incorporarse en un contexto molecular que aumente la reactividad. Por ejemplo, los grupos alquínico pueden incorporarse en un anillo, por ejemplo, un anillo de ciclooctileno, como una ciclooctina deformada con diarilo. La "segunda asa química" proporcionada por los residuos de pAMF son grupos azido. Como se sabe en la técnica, la reacción en este caso es una cicloadición [3+2] denominada en la técnica "cicloadición azida-alquino promovida por deformación" (SPAAC), que se analiza con mayor detalle más abajo.

Activación de antígenos:

El antígeno para los conjugados puede activarse usando cualquier método químico descrito para la producción de bioconjugados. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, oxidación de peryodato, desenmascaramiento de un aldehído intrínseco (por ejemplo, un extremo terminal reductor de un polisacárido) o activación de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP). Otras estrategias químicas para la derivatización de sacáridos se describen en Hermanson (Hermanson, Greg. Bioconjugate Techniques (2008)). La activación puede usar reactivos cianilantes (como p-nitrofenilcianato, CDAP o tetrafluoroborato de N-

cianotrietilamonio), ésteres activos, carbodiimidas, hidrazidas, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU, etc.

- 5 El antígeno para los conjugados puede activarse de acuerdo con cualquiera de las químicas analizadas a continuación, por ejemplo, el producto de hacer reaccionar el antígeno con uno o más de los grupos DBCO y DIFO analizados a continuación.

Activación con peryodato:

- 10 En algunas realizaciones, el antígeno se activa por oxidación con peryodato. En algunas realizaciones, la oxidación con peryodato se usa para introducir grupos aldehído en un antígeno, y es útil para la adición de aldehídos a: 1) polisacáridos; y 2) residuos N-terminales de polipéptidos para producir un antígeno activado. El peryodato escinde los enlaces carbono-carbono que poseen un hidroxilo primario o secundario o una amina en cualquier extremo, y así activa los residuos de azúcar de carbohidratos que contienen hidroxilos adyacentes, o los aminoácidos que contienen la fracción 2-aminoalcohol (residuos N-terminales de treonina o serina). Como la fracción de aldehído tiene una vida media larga, los antígenos activados mediante este método se purifican opcionalmente cromatográficamente y/o se liofilizan después de la activación.

- 20 Para la oxidación con peryodato de antígenos: (a) los antígenos se disuelven en una solución; (b) se añade una fuente de peryodato al antígeno a partir de una solución madre concentrada para formar una mezcla de oxidación; (c) se incuba la mezcla de reacción; y (d) (opcional) se elimina el exceso de peryodato.

- 25 Para la reacción de oxidación se usa opcionalmente agua desionizada o una solución tamponada adecuada. En algunas realizaciones, la solución en el paso (a) es agua desionizada. En algunas realizaciones, la solución en el paso (a) comprende una cantidad eficaz de un tampón con un pKa alrededor del pH fisiológico. En algunas realizaciones, la solución en el paso (a) comprende una cantidad eficaz de un tampón con un pKa en torno al pH fisiológico, en donde el tampón no comprende un grupo amina. Ejemplos de tampones libres de aminas incluyen, pero no se limitan a, acetato, formiato, y fosfato.

- 30 La fuente de peryodato en el paso (b) se selecciona opcionalmente de cualquier fuente de peryodato con estabilidad apropiada en solución acuosa. Los ejemplos de fuentes de peryodato incluyen, pero no se limitan a, peryodato de sodio, peryodato de potasio, (meta)peryodato de tetrabutilamonio, peryodato de bario, peryodato de hidrógeno de sodio, (para)peryodato de sodio y (meta)peryodato de tetraetilamonio.

- 35 En algunas realizaciones, el nivel de adición de peryodato y las condiciones de reacción se ajustan para convertir todos los dioles disponibles en un polisacárido en aldehídos. Por ejemplo, grandes excesos de peryodato sódico (> 1000x de exceso con respecto a la concentración molar de polisacárido, o una solución 10mM de peryodato de sodio) en combinación con la incubación a temperatura ambiente favorecen la conversión total de los dioles en aldehídos.

- 40 En algunas realizaciones, el nivel de adición de peryodato y las condiciones de reacción se ajustan para introducir una cantidad baja de oxidación/formación de aldehído en la cadena de polisacáridos. Cantidades menores que estequiométricas de peryodato de sodio (por ejemplo < 1.0 equivalentes) en la reacción de oxidación favorecen cantidades bajas de oxidación de la cadena de polisacáridos. Por ejemplo, un sacárido bacteriano se activa con 0,001-0,7, 0,005-0,5, 0,01-0,5, 0,1-1,2, 0,1-0,5, 0,1-0,2, 0,5-0,8, 0,1-0,8, 0,3-1,0 o 0,4-0,9 equivalentes molares de peryodato (véase el documento WO2011/110531). En otra realización, se añade un equivalente molar de 0,4 de peryodato a una solución de pH 6,0 que contiene un polisacárido capsular neumocócico y se incuba durante 17 horas a 25°C (véase el documento WO2011/110531).

- 50 En una realización, menos del 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% o 50% de los dioles vicinales de un sacárido bacteriano se oxidan durante la activación con peryodato (véase el documento WO2011/110531), por ejemplo, entre el 5 y el 10%. Las bajas temperaturas de reacción también favorecen cantidades menores de oxidación de la cadena de polisacáridos. En algunas realizaciones se combinan concentraciones bajas de peryodato (<0,1 eq) con reacciones durante la noche a 4°C para minimizar la oxidación de la cadena de polisacáridos de polisacáridos capsulares particulares, como *S. pneumoniae* 19F.

- 60 En algunas realizaciones, el nivel de adición de peryodato y las condiciones de reacción se ajustan para dirigir la escisión a azúcares selectivos de una cadena de polisacárido. Por ejemplo, en la bibliografía se usa NaIO₄ 1mM a 4 grados Celsius para oxidar selectivamente residuos de ácido siálico en los carbonos 7, 8 o 9, mientras que se usa NaIO₄ 10mM a temperatura ambiente para oxidar una amplia variedad de residuos de azúcar, incluyendo residuos de ácido siálico, galactosa y manosa.

- 65 Para la oxidación de residuos N-terminales de serina o metionina en antígenos proteicos, generalmente se usan condiciones de oxidación más suaves (concentraciones de peryodato y tiempos de reacción bajos), para evitar daño oxidativo a las cadenas laterales internas de los antígenos. En una realización, el paso (b) comprende añadir

periyodato de sodio a una concentración final de 2,5 mM y el paso (c) comprende incubar la mezcla de la reacción a 25 grados Celsius durante 3 minutos.

Como el exceso de periyodato sin reaccionar puede provocar niveles de oxidación más altos que los deseables o dañar las fracciones inmunogénicas del antígeno, en el paso (d) se elimina opcionalmente el exceso de periyodato. Para antígenos grandes (>10 kDa), el exceso de periyodato, en algunas realizaciones, se elimina por exclusión por tamaño, diálisis o diafiltración contra agua o solución tampón usando un medio con un punto de corte de peso molecular o límite de exclusión adecuados. Para antígenos pequeños en los que la purificación a base de el tamaño es inconveniente (péptidos cortos u oligosacáridos), y la eliminación del periyodato en el paso (d) comprende añadir un agente de inactivación. El exceso de periyodato se inactiva opcionalmente mediante la adición de glicerol (10% (v/v)), la adición de un exceso molar de sulfito de sodo o la adición de un exceso molar de N-acetilmetionina.

En algunas realizaciones, se desprotege un polisacárido o antígeno proteico para aumentar la accesibilidad de los grupos hidroxilo o amina para la activación con periyodato. En una realización, se eliminan los grupos O-acetilo o N-acetilo de los polisacáridos para aumentar la reactividad de los hidroxilos adyacentes con el periyodato. En el caso de antígenos de polisacáridos, la des-O-acetilación o des-N-acetilación se logra opcionalmente mediante incubación en una solución ácida suave (por ejemplo, HCl a baja concentración) o alcalina (por ejemplo, bicarbonato sódico), seguido opcionalmente de calentamiento y ajuste de vuelta al pH fisiológico. En algunas realizaciones, se usa tratamiento con ácido suave (<0,1M HCl o <0,2M AcOH), seguido de calentamiento y neutralización para hidrolizar parcialmente ("dimensionar") polisacáridos de alto peso molecular. En algunas realizaciones, se usa tratamiento con ácido suave (por ejemplo, <0,1M HCl o <0,2M AcOH), seguido de calentamiento (45-95°C) y neutralización (a pH 5,5-6,0) para hidrolizar parcialmente ("dimensionar") simultáneamente los polisacáridos de alto peso molecular y desproteger el polisacárido. En algunas realizaciones, se tratan los serotipos 3, 4, 18C y 11A mediante dicho proceso de ácido/calentamiento/neutralización para desproteger el polisacárido, dimensionar el polisacárido, o ambos. En una realización, se trata el polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae* con ácido acético 0,18M, seguido de calentamiento a 85°C durante 1 hora. En una realización, se trata el polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* con HCl 0,01M seguido de calentamiento a 45° C durante 1 hora. En una realización, se trata el polisacárido 18C de *S. pneumoniae* con ácido acético 0,18M seguido de calentamiento a 95°C durante 40 minutos. En una realización, se trata el polisacárido del serotipo 11A de *S. pneumoniae* con ácido acético 0,18M, seguido de calentamiento a 80°C durante 1 hora.

En otra realización, se eliminan los grupos N-formilo en las proteínas purificadas / se desformilan los grupos amino mediante tratamiento con una amidohidrolasa de péptido de formil-L-metionilo en agua desionizada o en una solución tamponada de pH fisiológico. En otra realización más, los grupos N-formilo en las proteínas purificadas se eliminan mediante tratamiento de la proteína liofilizada con vapor de hidracina anhidra a -5°C (Miyataki et al. Eur. J Biochem. 212, 785-789 (1993)).

Activación con CDAP

En algunas realizaciones, el antígeno se activa formando un aducto transitorio con tetrafluoroborato de ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) (véase, por ejemplo, los documentos WO2011/110531 y US20120321658). En algunas realizaciones, los grupos hidroxilo de una proteína o antígeno polisacárido se activan por reacción con CDAP para formar un aducto transitorio de cianato (-OCN), que luego se hace reaccionar con un nucleófilo adecuado en un asa química o conector para formar un enlace de carbamimidato. En esta realización, los enlaces C-C del antígeno no se escinden (a diferencia de la activación con periyodato). En algunas realizaciones, se activan preferentemente polisacáridos capsulares particulares usando CDAP. En realizaciones particulares, los polisacáridos capsulares del serotipo 3, 7F o 10A de *S. pneumoniae* se activan usando CDAP.

Para la activación con CDAP de antígenos: (a) el antígeno se disuelve en un solvente adecuado; (b) se añade CDAP al antígeno a partir de una solución madre; (c) se añade un agente tampón.

La activación con CDAP se realiza opcionalmente en cualquier solvente adecuado. En algunas realizaciones, el solvente en (a) comprende agua destilada. En realizaciones adicionales, el solvente en (a) comprende además un solvente orgánico como DMSO o acetonitrilo. En realizaciones particulares, los polisacáridos capsulares del serotipo 3, 7F o 10A de *S. pneumoniae* se activan en agua.

En algunas realizaciones, para la activación se usan cantidades supra- o subestequiométricas (con respecto al polisacárido) de CDAP. En algunas realizaciones, para la activación de un polisacárido se usan aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 3 eq de CDAP. En algunas realizaciones, para la activación de un polisacárido se usan aproximadamente 0,2-0,8 eq de CDAP. En una realización, el polisacárido capsular del serotipo 3 de *S. pneumoniae* se activa usando 2,0 eq de CDAP. En una realización, el polisacárido capsular del serotipo 10A de *S. pneumoniae* se activa usando 0,8 eq de CDAP.

En algunas realizaciones, se usa la adición de un agente tampón en (c) para aumentar drásticamente la eficiencia de la activación con CDAP (Lees et al. Vaccine. 1996 (14): 190-198). En algunas realizaciones, el agente

tampón en (c) es trietanolamina (TEA). En algunas realizaciones, como agente tampón se usan de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 eq de TEA (con respecto al polisacárido). En una realización, como agente tampón para una reacción de activación con CDAP que implica polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* se usan de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 eq de TEA. En algunas realizaciones, como agente tampón se usan 2,5 eq de TEA. En una realización, como agente tampón para una reacción de activación con CDAP que implica polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* se usan 2,5 eq de TEA. En algunas realizaciones, el agente tampón es borato sódico, carbonato sódico o hidróxido de sodio, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente tampón tiene un pKa de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 11,0 o el agente tampón se usa para ajustar el pH de la solución de reacción a entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 11,0. En algunas realizaciones, el agente tampón tiene un pKa de entre aproximadamente 9,0 y aproximadamente 9,5 o el agente tampón se usa para ajustar el pH de la solución de reacción a entre aproximadamente 9,0 y aproximadamente 9,5. En una realización, se usa ajuste de hidróxido de sodio del pH a 9,5 para una reacción de activación de CDAP que implica polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae*. En una realización, se usa el ajuste de hidróxido de sodio del pH a 9,5 para una reacción de activación con CDAP que implica polisacárido del serotipo 10A de *S. pneumoniae*.

Sin activación química:

En algunas realizaciones, se usan aminas endógenas u otras fracciones nucleófilas (por ejemplo, una amina primaria) o presentes de manera natural o como resultado de un paso de desprotección (por ejemplo, como se ha analizado anteriormente) para conjugar un polisacárido dado con un asa química o proteína portadora. Tales fracciones nucleófilas pueden hacerse reaccionar convenientemente con una variedad de reactivos de conjugación electrofílicos comunes, como los derivados de succinato (por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS) o ésteres sulfo-NHS). En tales realizaciones, a veces es ventajoso tratar con un protocolo de peryodato como en (i) para promover la degradación de contaminantes antigénicos como el C-polisacárido de *S. pneumoniae*. En esta realización, el tratamiento con peryodato va seguido de un gran exceso de borohidruro de sodio para inactivar cualquier grupo aldehído introducido químicamente. En una realización, el polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae* se trata con entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,25 eq de peryodato sódico a temperatura ambiente durante entre aproximadamente 12 y aproximadamente 14 horas, seguido de un tratamiento con entre aproximadamente 5eq y aproximadamente 15eq de borohidruro de sodio. En una realización, el polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae* se trata con 0,15 eq de peryodato sódico a temperatura ambiente durante 18 horas, seguido de tratamiento con 10eq de borohidruro de sodio.

Conjugación con asa química:

En algunas realizaciones, el antígeno se conjuga con el asa química usando cualquier método químico compatible con los métodos de activación descritos anteriormente ("Activación de antígenos"). Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la formación de bases de Schiff con aldehídos de antígeno sintéticos seguido de aminación reductora, formación de hidrazona, formación de oxima, adición nucleofílica directa y formación de bases de Schiff con aldehídos de antígeno nativos seguido de aminación reductora. En algunas realizaciones, la concentración absoluta de polisacárido en una reacción de conjugación con un asa química es importante para minimizar la agregación o la reactividad cruzada del polisacárido. En algunas realizaciones, la concentración absoluta de polisacárido/antígeno en una reacción de conjugación con DBCO (un dibenzociclo-octano) o un derivado de DBCO es importante para polisacáridos activados con peryodato o CDAP. En algunas realizaciones, la concentración de polisacárido en una reacción de conjugación con DBCO/derivado de DBCO es de menos de 2, de menos de 5, de menos de 7, de menos de 10, de menos de 15, de menos de 17,5 o de menos de 20 $\mu\text{mol/ml}$. En algunas realizaciones, la concentración de polisacárido en una reacción de conjugación de DBCO/derivado de DBCO es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 17,5 $\mu\text{mol/ml}$.

Reacciones con antígenos activados por peryodato:

En algunas realizaciones, el asa química se conjuga con un antígeno polipéptido o polisacárido activado como se ha indicado anteriormente ("Activación de antígenos") con peryodato. En estas realizaciones, un asa química que comprende un grupo funcional que forma un aducto estable o semiestable con aldehídos se combina con el antígeno activado con peryodato, seguido de una reducción opcional para convertir los aductos semiestables en aductos estables (véase, por ejemplo, el documento WO2014/111344; Wu et al. Vaccine 31(2013): 5623-2626; Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Segunda Edición, 2008). En algunas variaciones de estas realizaciones, el asa química se añade en un exceso molar grande con respecto a los grupos aldehído en el antígeno activado, de tal manera que todos los aldehídos se consumen en la reacción de conjugación de asa química/antígeno. En otras variantes de estas realizaciones, el asa química se añade en una relación molar menor con respecto a los grupos aldehído del antígeno activado, y el exceso de aldehídos sin reaccionar en el antígeno activado se consume mediante una reacción adicional con un exceso de un nucleófilo reactivo con aldehído barato (por ejemplo, etanolamina), o mediante tratamiento con un agente reductor lo suficientemente fuerte como para reducir los aldehídos a grupos hidroxilo (por ejemplo, NaBH_4).

En una realización, el asa química se conjuga con el antígeno mediante la formación de una base de Schiff

con aldehídos de antígeno sintéticos seguido de una aminación reductora. Esta realización da como resultado un producto final que tiene un enlace de amina secundaria entre el asa química y el antígeno: un enlace N-C directo entre la amina del asa química y un átomo de carbono en el antígeno. En esta realización, el asa química comprende una amina. En esta realización, el método de conjugación comprende: combinar el asa que contiene amina con el antígeno activado con peryodato en agua DI o solución tamponada que contenga DMSO; incubar para formar una base de Schiff; reducir la base de Schiff a una amina secundaria usando cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN); y opcionalmente inactivar los aldehídos que no hayan reaccionado con el NaBH_4 . En algunas realizaciones de este método, el asa química y el antígeno se combinan en una estequiometría de o cercana a 1:1. En algunas realizaciones de este método, el asa química y el antígeno se combinan con un exceso molar de asa química. En algunas realizaciones de este método, el asa química y el antígeno se combinan con un exceso molar de antígeno. En algunas realizaciones, el cianoborohidruro de sodio se sustituye por otro agente reductor con selectividad similar para reducir los enlaces C=N, como el triacetoxiborohidruro de sodio.

En una realización, el asa química se conjuga con el antígeno mediante la formación de hidrazona. En esta realización, el asa química comprende un grupo hidrazida ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$). Esta realización da como resultado un producto final que tiene un enlace hidrazona ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-$) o N'-alquil hidrazida ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}-$) entre el asa química y el carbono del antígeno. En esta realización, el método de conjugación comprende: combinar un exceso molar del asa química que contiene hidrazida con el antígeno en una solución de pH 6,0-8,5 e incubar para formar una hidrazona ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-$). En algunas realizaciones adicionales de este método, en la mezcla de reacción se incluye cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio para reducir el enlace N=C, lo que produce una N'-alquil hidrazida ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}-$).

En una realización, el asa química se conjuga con el antígeno mediante formación de oxima. En esta realización, el asa química comprende un grupo aminooxi ($-\text{O}-\text{NH}_2$). Esta realización da como resultado un producto final que tiene un enlace oxima ($-\text{O}-\text{N}=\text{C}-$) entre el asa química y un carbono del antígeno. En esta realización, el método de conjugación comprende: combinar un exceso molar del asa química que contiene aminooxi con el antígeno en una solución de pH 6,0-8,5 e incubar para formar un enlace oxima ($-\text{O}-\text{N}=\text{C}-$). En algunas realizaciones adicionales de este método, se incluye cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio en la mezcla de reacción para reducir el enlace N=C y mejorar la estabilidad; esto produce un enlace N'-alquil hidroxilamina ($-\text{O}-\text{N}-\text{C}-$).

Reacciones con antígenos activados por CDAP:

En algunas realizaciones, el asa química se conjuga con un antígeno polipéptido o polisacárido activado como se ha descrito anteriormente ("activación con CDAP") con CDAP. En estas realizaciones, se hace reaccionar adicionalmente con un asa química que contiene amina un grupo cianato transitorio ($-\text{OCN}$) producido mediante activación con CDAP para producir un enlace carbamimidato ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{O}-$) entre el asa química y un carbono del antígeno.

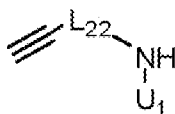
Para la conjugación con CDAP de asas químicas, los grupos hidroxilo del antígeno se activan como se ha descrito anteriormente ("activación con CDAP"), y se añade adicionalmente a la mezcla de activación un asa química que comprende una amina. Como el grupo cianato es lábil, el asa química se añade generalmente poco después (en el plazo de minutos) después de la activación del antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno se añade 2,5 minutos después de que se haya introducido el CDAP. En algunas realizaciones, se añade un exceso molar grande del asa química que contiene amina con respecto a los grupos hidroxilo activados en el antígeno. En otras realizaciones, el asa química se añade a una concentración más cercana a la relación molar 1:1 con respecto a los grupos hidroxilo activados en el antígeno, y el exceso de grupos cianato sin reaccionar se agota mediante la adición de un exceso de una amina barata (por ejemplo, etanolamina o hexanodiamina).

Reacciones con antígenos no activados:

En algunas realizaciones, el asa química se conjuga con una amina endógena u otra fracción nucleófila (por ejemplo, una amina primaria) o presente de manera natural o como resultado de un paso de desprotección de un antígeno polipéptido o polisacárido, como se ha descrito anteriormente. En una realización de esto, un grupo electrófilo (por ejemplo, un éster NHS o sulfo-NHS) en un asa química se hace reaccionar con un grupo amina primaria en el antígeno para producir un enlace amida ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$) entre el asa química y la amina del antígeno. En otra realización, se hace reaccionar un grupo ácido carboxílico de un asa química con un grupo amina primaria del antígeno en presencia de reactivos y condiciones de acoplamiento de péptidos estándar para producir un enlace amida entre el asa química y la amina del antígeno.

Asas que contienen alquinos

En algunas realizaciones, el asa química comprende una fracción que permite una reacción química de "clic" con un grupo correspondiente en un residuo pAMF de un polipéptido. Una de tales fracciones es un grupo alquino capaz de reaccionar con un residuo de pAMF que comprende un grupo azido. En la realización más sencilla, este es un grupo propargilo, de tal manera que un grupo alquino en un antígeno comprende una estructura de fórmula IV:

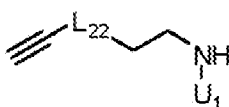


en donde:

L_{22} es alquilo C_1-C_{10} ; y

U_1 es por lo menos una fracción de un antígeno.

En otras realizaciones, un grupo alquino en un antígeno comprende una estructura de fórmula IVa:

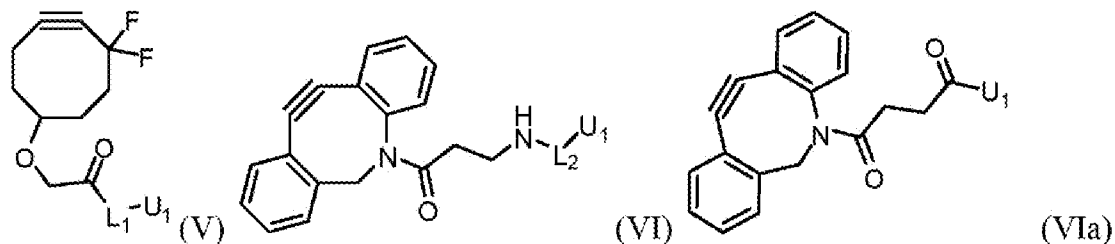


en donde:

L_{22} es $-(CH_2CH_2O)_{1-10}$; y

U_1 es por lo menos una fracción de un antígeno.

En algunas realizaciones, el grupo alquino comprende además características adicionales que aceleran o facilitan la reacción del alquino con un grupo azido. Un ejemplo de tal característica es una estructura de anillo de 8 miembros (por ejemplo, ciclo-octano), de tal manera que un grupo alquino en un antígeno comprende además un grupo DIFO o DBCO. En algunas realizaciones, un grupo alquino en un antígeno comprende una estructura de fórmula V, fórmula VI, o VIa:



en donde:

L_1 es independientemente un enlace, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-NH(L_{12})-$, $-O(L_{12})-$, o $-S(L_{12})-$;

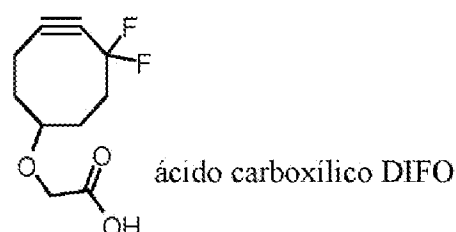
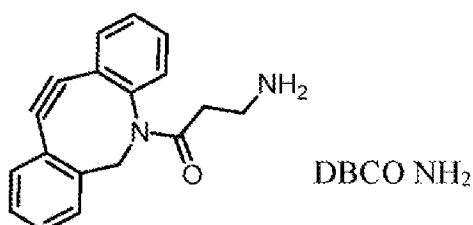
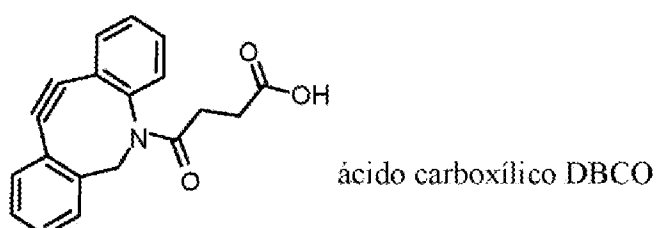
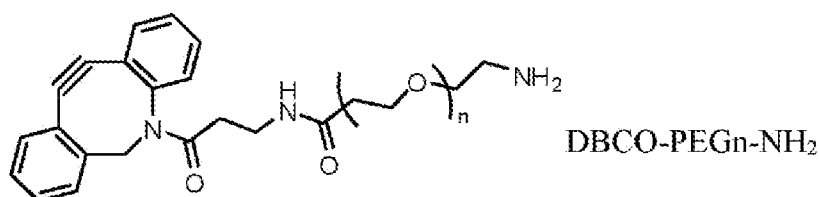
L_2 es independientemente un enlace, $-C(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-C(=O)L_{12}-$, $-S(=O)_2L_{12}-$;

L_{12} es independientemente L_{22} o $L_{22}NH-$.

L_{22} es independientemente alquilo C_1-C_{10} o $-(CH_2CH_2O)_{1-10}$; y

U_1 es independientemente por lo menos una fracción de un antígeno.

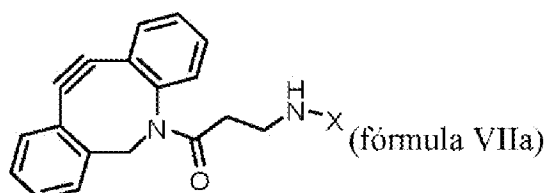
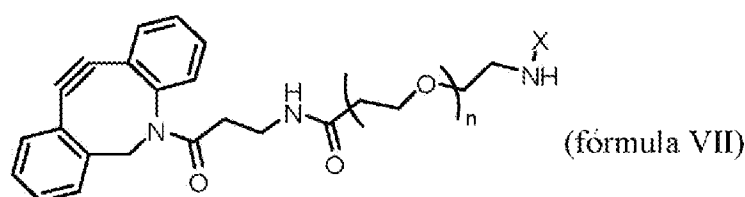
En algunas realizaciones, las estructuras de fórmula V y VIa se forman convenientemente a partir de un antígeno que comprende un grupo nucleófilo (por ejemplo, una amina primaria) y el éster NHS o sulfo-NHS de los ácidos carboxílicos DIFO o DBCO correspondientes de las estructuras V y VIa. En algunas realizaciones, las estructuras de fórmula VI se forman convenientemente a partir de un antígeno activado y un derivado de DBCO como DBCO-NH₂ o DBCO-PEGn-NH₂. En algunas realizaciones, DBCO-PEGn-NH₂ es DBCO-PEG₄-NH₂.



El valor de "n" en "PEG_n" representa el número de unidades de repetición de oxietileno, por ejemplo, en la estructura mostrada anteriormente, o dentro de la fórmula VII, fórmula VIIb, fórmula XI, o la fracción "A", o dentro del poli(alquilo)xi de L₂₂. El valor de n está en el intervalo 1-20, por ejemplo, dentro de 2-18, 3-16, o 4-14. Así, n puede ser, por ejemplo, 4, 5, 11, 12 o 13.

En algunas realizaciones de las fórmulas IV, V o VI, la fracción de U₁ es por lo menos un poliol de un polisacárido.

En otras realizaciones, un antígeno que comprende un alquino comprende una estructura de fórmula VII o VIIa:

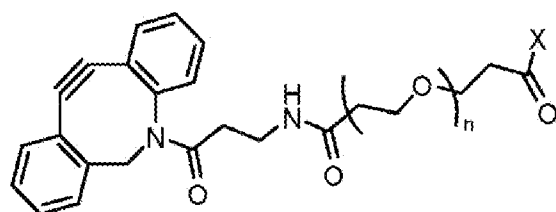


en donde:

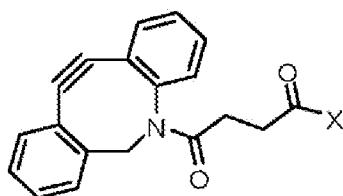
X es independientemente por lo menos un poliol de un polisacárido; y
n es por lo menos 1.

Cuando un grupo (por ejemplo, X, Y o U₁) se describe como un poliol, esto puede referirse a una unión química a un poliol dentro del polisacárido (por ejemplo, a un monosacárido dentro del polisacárido, tal monosacárido es un poliol). La unión en sí puede ser a cualquier grupo funcional adecuado (por ejemplo, a un aldehído, que puede surgir de la oxidación de un diol vecinal).

En realizaciones adicionales, un antígeno que comprende un alquino comprende una estructura de fórmula VIIb o VIIc.



(fórmula VIIb)



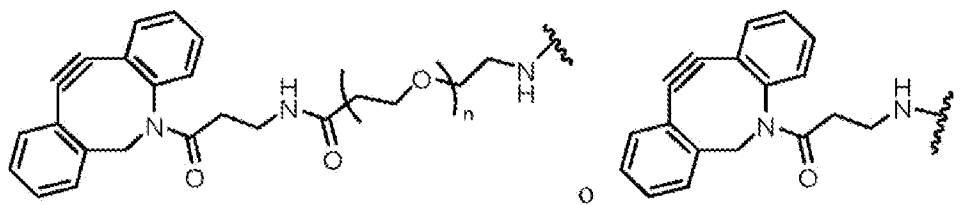
(fórmula VIIc)

en donde:

X es independientemente una amina de por lo menos un aminoazúcar de un polisacárido; y n es por lo menos 1.

En algunas realizaciones, un antígeno que comprende un alquino comprende un polisacárido de acuerdo con (A-X)_z-Y, en donde:

A es



X es independientemente por lo menos un poliol;
Y es independientemente por lo menos un poliol de un polisacárido;
n es por lo menos 1; y
z es mayor que 1.

En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido comprende por lo menos un 1,5%, por lo menos un 3%, por lo menos un 4%, por lo menos un 5%, por lo menos un 6%, por lo menos un 7%, por lo menos un 8%, por lo menos un 9%, por lo menos un 10%, por lo menos un 11%, por lo menos un 12%, por lo menos un 13%, por lo menos un 14%, por lo menos un 15%, por lo menos un 16%, por lo menos un 17%, por lo menos un 18%, por lo menos un 19%, o por lo menos un 20% (p/p) de DBCO unido covalentemente. En algunas realizaciones, el antígeno comprende más de aproximadamente un 1,5% (p/p) de DBCO. En algunas realizaciones, el antígeno comprende más del 3% (p/p) de DBCO. En algunas realizaciones, el antígeno comprende como máximo un 20%, como máximo un 19%, como máximo un 18%, como máximo un 17%, como máximo un 16%, como máximo un 15%, como máximo un 14%, como máximo un 13%, como máximo un 12%, como máximo un 11%, como máximo un 10%, como máximo un 9%, como máximo un 8%, como máximo un 7%, como máximo un 6%, como máximo un 5%, como máximo un 4%, como máximo un 3,5%, como máximo un 3,0%, como máximo un 2,5%, como máximo un 2,0%, o como máximo aproximadamente un 1,7% (p/p) de DBCO unido covalentemente. En algunas realizaciones, el antígeno comprende menos del 20% (p/p) de DBCO unido covalentemente. En otras realizaciones, el antígeno comprende menos del 10% (p/p) de DBCO unido covalentemente. En algunas realizaciones el antígeno comprende entre aproximadamente un 1,5 y un 20%, un 3% y un 20%, un 3% y un 18%, un 3% y un 16%, un 3% y un 14%, un 3% y un 12%, un 3% y un 10%, un 3% y un 8%, un 3% y un 6%, o un 3% y un 4%, o un 1,5 y un 9% (p/p) de DBCO unido covalentemente.

En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido comprende por lo menos un 3%, por lo menos un 4%, por lo menos un 5%, por lo menos un 6%, por lo menos un 7%, por lo menos un 8%, por lo menos un 9%, por lo menos un 10%, por lo menos un 11%, por lo menos un 12%, por lo menos un 13%, por lo menos un 14%, por lo menos un

15%, por lo menos un 16%, por lo menos un 17%, por lo menos un 18%, por lo menos un 19%, o por lo menos un 20% de moléculas de DBCO por cada 100 unidades de repetición de polisacárido. En algunas realizaciones, el antígeno comprende más del 3% de moléculas de DBCO por 100 unidades de repetición de polisacárido. En algunas realizaciones, el antígeno comprende como máximo un 20%, como máximo un 19%, como máximo un 18%, como máximo un 17%, como máximo un 16%, como máximo un 15%, como máximo un 14%, como máximo un 13%, como máximo un 12%, como máximo un 11%, como máximo un 10%, como máximo un 9%, como máximo un 8%, como máximo un 7%, como máximo un 6%, como máximo un 5%, como máximo un 4%, o como máximo un 3,5% de moléculas de DBCO unidas covalentemente por 100 unidades de repetición de polisacárido. En algunas realizaciones, el antígeno comprende menos del 20% de DBCO unido covalentemente por unidad de repetición de polisacárido. En otras realizaciones, el antígeno comprende menos del 10% de moléculas de DBCO unidas covalentemente por cada 100 unidades de repetición de polisacáridos. En algunas realizaciones, el antígeno comprende entre aproximadamente un 3% y un 20%, un 3% y un 18%, un 3% y un 16%, un 3% y un 14%, un 3% y un 12%, un 3% y un 10%, un 3% y un 8%, un 3% y un 6%, o un 3% y un 4% de moléculas de DBCO unidas covalentemente por cada 100 unidades de repetición de polisacáridos.

En una realización, el polisacárido tiene un peso molecular de entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 10.000 kDa. En otras de tales realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 10.000 kDa. En realizaciones adicionales, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 10.000 kDa; entre 50 kDa y 9.500 kDa; entre 50 kDa y 9.000 kDa; entre 50 kDa y 8.500 kDa; entre 50 kDa y 8.000 kDa; entre 50 kDa y 7.500 kDa; entre 50 kDa y 7.000 kDa; entre 50 kDa y 6.500 kDa; entre 50 kDa y 6.000 kDa; entre 50 kDa y 5.500 kDa; entre 50 kDa y 5.000 kDa; entre 50 kDa y 4.500 kDa; entre 50 kDa y 4.000 kDa; entre 50 kDa y 3.500 kDa; entre 50 kDa y 3.000 kDa; entre 50 kDa y 2.500 kDa; entre 50 kDa y 2.000 kDa; 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 10.000 kDa; entre 100 kDa y 9.500 kDa; entre 100 kDa y 9.000 kDa; entre 100 kDa y 8.500 kDa; entre 100 kDa y 8.000 kDa; entre 100 kDa y 7.500 kDa; entre 100 kDa y 7.000 kDa; entre 100 kDa y 6.500 kDa; entre 100 kDa y 6.000 kDa; entre 100 kDa y 5.500 kDa; entre 100 kDa y 5.000 kDa; entre 100 kDa y 4.500 kDa; entre 100 kDa y 4.000 kDa; entre 100 kDa y 3.500 kDa; entre 100 kDa y 3.000 kDa; entre 100 kDa y 2.500 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 10.000 kDa; entre 200 kDa y 9.500 kDa; entre 200 kDa y 9.000 kDa; entre 200 kDa y 8.500 kDa; entre 200 kDa y 8.000 kDa; entre 200 kDa y 7.500 kDa; entre 200 kDa y 7.000 kDa; entre 200 kDa y 6.500 kDa; entre 200 kDa y 6.000 kDa; entre 200 kDa y 5.500 kDa; entre 200 kDa y 5.000 kDa; entre 200 kDa y 4.500 kDa; entre 200 kDa y 4.000 kDa; entre 200 kDa y 3.500 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 2.500 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. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores se contempla como una realización de la divulgación.

En una realización, el polisacárido tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 1.400 kDa. En una realización, el polisacárido tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 3.000 kDa.

Los conjugados para las composiciones pueden producirse usando un método para producir un glicoconjugado que comprende: (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica una proteína portadora, en donde el ácido nucleico comprende un codón de supresión; (b) crear una mezcla de reacción combinando el ácido nucleico con un extracto bacteriano libre de células que comprende 4-azidometilfenilalanina (pAMF), un ARNt complementario al codón de supresión y una aminoacil-ARNt sintetasa; (c) incubar la mezcla de reacción de (b) en condiciones suficientes para incorporar selectivamente pAMF en un sitio correspondiente al codón de supresión en la proteína portadora; y (d) conjugar el pAMF con un polisacárido mediante una cicloadición [2+3]. La cicloadición [2+3] puede comprender la reacción entre una azida y un grupo alquino. El paso (c) puede comprender la incubación de la mezcla de reacción a menos de 20 grados Celsius. El método puede comprender adicionalmente purificar la proteína portadora inmediatamente después de (c). El codón de supresión puede sustituirse selectivamente en el codón 25, 34, 38, 40, 213, 215, 228, 245, 265, 386, 523 o 527 de la SEQ ID NO:2. La mezcla de la reacción en (b) puede comprender además componentes biológicos necesarios para la síntesis de proteínas. El ARNt de (b) puede ser capaz de cargarse con pAMF. La aminoacil-ARNt sintetasa en (b) puede aminoacilar preferentemente el ARNt con pAMF en comparación con los 20 aminoácidos naturales. El grupo alquino puede comprender una fracción de DBCO conjugada con el polisacárido. El pAMF puede conjugarse con el polisacárido para generar un conjugado de fórmula X, Xa, XI o Xia.

Conjugados polipéptido-antígeno:

En una realización, el antígeno no está enlazado a un aminoácido natural del polipéptido inmunogénico. En otra realización, el antígeno no está enlazado a una lisina dentro del polipéptido inmunogénico. Por ejemplo, el antígeno no está enlazado a una lisina en la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el antígeno sólo está enlazado a los dos o más residuos de pAMF del polipéptido inmunogénico. Por ejemplo, el antígeno sólo está enlazado a dos o más pAMF en la SEQ ID NO: 1. Los dos o más residuos de pAMF se localizan opcionalmente en el extremo N-terminal, el

extremo C-terminal, o en cualquier parte en entre los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido inmunogénico.

En una realización, el antígeno está enlazado a un aminoácido situado fuera de un epítipo de células T del polipéptido inmunogénico. En otra realización, ningún antígeno está enlazado a un aminoácido situado dentro de un epítipo de células T de un polipéptido inmunogénico.

Los aminoácidos seleccionados para la conjugación dentro de un polipéptido inmunogénico pueden comprender uno o más residuos accesibles en superficie sobre la base de la estructura cristalina (u otra estructura 3D, como una estructura de NMR) del polipéptido. Adicional o alternativamente, puede realizarse una sustitución completa de aminoácidos naturales por nnAA en un polipéptido inmunogénico seguido de conjugación, para evaluar la utilidad de sitios específicos en el polipéptido para la conjugación.

En una realización, el antígeno se conjuga con la proteína portadora mejorada indirectamente (por ejemplo, combinando primero la proteína portadora mejorada o el antígeno con un conector reactivo y, a continuación, combinando el aducto proteína portadora mejorada-conector o antígeno-conector con un antígeno o proteína portadora mejorada, respectivamente). En otra realización, el antígeno se conjuga con la proteína portadora mejorada directamente (por ejemplo, combinando dos componentes que comprenden la proteína portadora mejorada y el antígeno juntos en una reacción). Cuando un conjugado incluye un conector, puede usarse cualquier grupo adecuado. Por ejemplo, un conjugado puede incluir un conector seleccionado entre ácido adípico, dihidrazida de ácido adípico (ADH), β -propionamido, nitrofenil-etilamina, haluros de haloacilo, enlaces glicosídicos, ácido 6-aminocaproico, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP), fracciones C₄ a C₁₂, etc. También pueden usarse conectores resultantes de los grupos DBCO y DIFO analizados anteriormente, por ejemplo, incluyendo el residuo de una fracción de diarilciclooctano, como el diarilcicloocteno. Generalmente, para la conjugación el conector se unirá a un antígeno, en lugar de unirse a un portador.

Como los conjugados antígeno-polipéptido pueden formar grandes complejos reticulados, con los métodos analíticos disponibles puede no ser posible medir o determinar directamente la localización exacta de algunas o todas las conjugaciones y otras características físicas. Se entiende, sin embargo, que tales localizaciones o características físicas pueden inferirse de manera fiable a partir del diseño de un esquema sintético, su producto esperado y los resultados analíticos coherentes con esa expectativa.

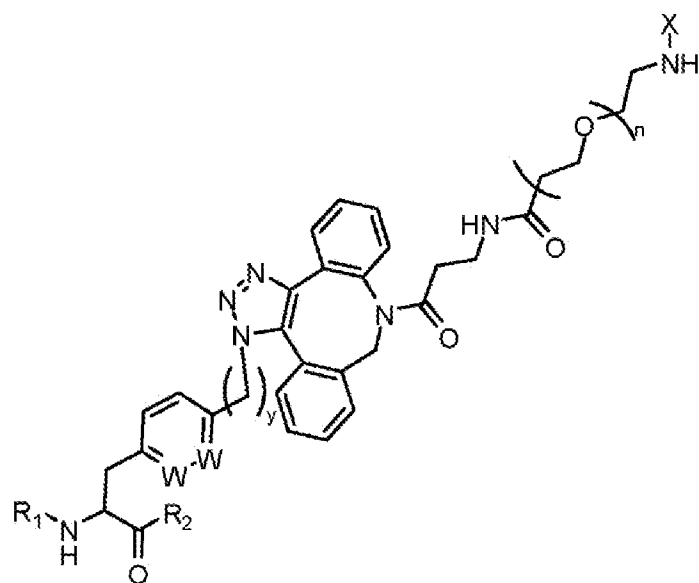
Reacción de conjugación antígeno-polipéptido

En algunas realizaciones, el antígeno se conjuga con la proteína portadora mejorada usando cualquier método químico adecuado para conjugar pAMF y asas químicas descritas en la presente. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la cicloadición alquino-azida catalizada por cobre(I) (CuAAC) y la cicloadición azida-alquino promovida por deformación (SPAAC). Como reacciones "clic", todas estas reacciones pueden realizarse en solución acuosa. También puede usarse la ligadura de Staudinger entre una fosfina y una azida.

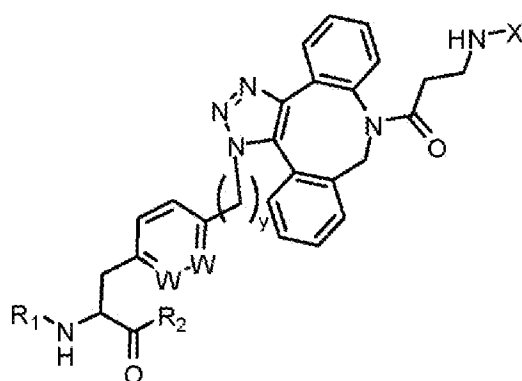
CuAAC: En algunas realizaciones, el antígeno se conjuga con la proteína portadora mejorada mediante una cicloadición de alquino-azida catalizada por cobre(I) (CuAAC). En una variación de esta realización, el antígeno comprende un grupo propargilo. Las condiciones adecuadas para la conjugación CuAAC de biomoléculas se encuentran, por ejemplo, en Presolski et al. Curr Protoc Chem Biol. 2011; 3(4): 153-162, todas las cuales implican la adición de Cu²⁺. En algunas realizaciones, la reacción se acelera mediante la adición de un ligando que coordina Cu, como THPA. En algunas realizaciones, la reacción se acelera mediante la adición de un agente reductor para mantener el estado de oxidación de Cu²⁺. Los agentes reductores adecuados incluyen ascorbato de sodio, DTT o TCEP.

SPAAC: En algunas realizaciones, el antígeno se conjuga con la proteína portadora mejorada mediante la cicloadición de azida-alqueno promovida por deformación (SPAAC). En una variación de estas realizaciones, el antígeno comprende un grupo ciclooctano. Como la SPAAC no requiere catalizadores ni cofactores adicionales, esta reacción puede realizarse en agua destilada, solución salina al 0,9%, PBS o una solución fisiológicamente tamponada. En una realización, la proteína portadora mejorada y el antígeno se combinan en una relación de masa de 1,20:1 (p/p).

En algunas realizaciones, el antígeno está enlazado al pAMF en la proteína portadora mejorada a través de una estructura de fórmula XI o XIa:



(fórmula XI)



(fórmula XIa)

en donde:

R₁ es independientemente H, formilo o por lo menos un aminoácido de la proteína portadora mejorada;

R₂ es independientemente OH o por lo menos un aminoácido de la proteína portadora mejorada;

W es C;

y es 1;

n es por lo menos 1; y

X es independientemente por lo menos un poliol de un polisacárido capsular.

El valor de "n" se ha analizado con anterioridad en relación con "PEGn". El valor de "y" se encuentra en el intervalo de 1-10, de acuerdo con la fórmula XII, y es preferiblemente un alquileo inferior, por ejemplo, un alquileo C1-C4.

Caracterización de conjugados

Métodos (exclusión por tamaño, diafiltración, diálisis): Después de la reacción de conjugación, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada de interés se purifican opcionalmente de acuerdo con métodos que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, interacción hidrófoba y exclusión por tamaño), exclusión por tamaño molecular (diálisis, diafiltración, filtración de flujo tangencial, filtración en profundidad) procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio) o SDS-PAGE (véase, por ejemplo, Protein Purification, J. C. Janson & Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener conjugados sustancialmente puros.

Las proteínas conjugadas de interés se cuantifican opcionalmente de acuerdo con métodos que incluyen, pero no se limitan a, electroforesis microfluidica, electroforesis en gel, transferencia western, inmunoensayos (por ejemplo, ELISA) y otros ensayos para evaluar la actividad de la proteína conjugada.

Parámetros físicos ejemplares

Un parámetro importante para los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada es el peso molecular del conjugado. Como los conjugados comprenden opcionalmente números variables de moléculas de antígeno conjugadas con cada molécula de proteína, así como enlaces cruzados variables de orden superior (enlaces proteína-antígeno-proteína, por ejemplo), el peso molecular de salida de un conjugado no es necesariamente predecible a partir de los pesos moleculares de entrada de las proteínas portadoras mejoradas y los antígenos. Una gran parte de la bibliografía (por ejemplo, Howard et al. *Immunology*. 1971(21): 535- 545 y Kabat & Bezer. *Arch Biochem Biophys*. 1958(78) 306-18) sugiere que el tamaño de las partículas antigénicas tiene un efecto importante sobre la inmunogenicidad. Wessels et al. (1998) *Infect Immun* 66:2186-92 informan de que el tamaño del conjugado y la reticulación pueden influir en la inmunogenicidad y la eficacia protectora de los conjugados GBS tipo III.

En términos generales, los conjugados pueden formarse enlazando una proteína portadora con un antígeno que tenga una o múltiples asas por antígeno. Con múltiples asas por antígeno puede formarse un conjugado reticulado, que implica enlaces proteína-antígeno-proteína. Con una única asa por antígeno (por ejemplo, un grupo terminal en un polisacárido) no se forma este tipo de entramado conjugado porque un único antígeno no puede unirse a múltiples moléculas de proteína portadora. En la presente, cuando se desean pesos moleculares más elevados se prefieren conjugados reticulados (particularmente para el neumococo) y, por lo tanto, se prefieren antígenos con múltiples asas.

En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de aproximadamente 750 kDa, aproximadamente 1.000 kDa, aproximadamente 1.500 kDa, aproximadamente 2.000 kDa, aproximadamente 2.500 kDa, aproximadamente 3.000 kDa, aproximadamente 3.500 kDa, aproximadamente 4.000 kDa, aproximadamente 4.500 kDa, aproximadamente 5.000 kDa, aproximadamente 5.500 kDa, aproximadamente 6.000 kDa, aproximadamente 6.500 kDa, aproximadamente 7.000 kDa, aproximadamente 7.500 kDa, o aproximadamente 8.000 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de por lo menos aproximadamente 750 kDa, por lo menos aproximadamente 1.000 kDa o por lo menos aproximadamente 1.500 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de entre aproximadamente 750 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de entre aproximadamente 800 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de entre aproximadamente 850 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de entre aproximadamente 900 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de entre aproximadamente 950 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado antígeno-proteína portadora mejorada tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 2.800 kDa.

Otro parámetro importante para las vacunas conjugadas de la presente divulgación es la relación entre el antígeno (es decir, el polisacárido) y el portador polipeptídico inmunogénico. La relación entre el polisacárido y la proteína (PS:PC) del conjugado purificado se expresa generalmente en términos de relación peso-peso (p/p). Tales relaciones se expresan convencionalmente para que incluyan cualquier polisacárido libre que se purifique junto con los glicoconjugados individuales. Las relaciones PS:PC más altas de los conjugados de polisacárido-proteína portadora permiten que se administre más antígeno polisacárido con una cantidad menor de proteína portadora mejorada. En el caso de las vacunas de neumococos conjugadas, la relación se encuentra típicamente en el intervalo de 0,3 a 3,0, pero puede variar con el serotipo y los aspectos de la química de conjugación Annex 2: Recommendations for the production and control of pneumococcal conjugate vaccines; WHO Technical Report Series, N° 927, 2005) La relación de la vacuna comercial Prevnar-13 es de 0,9 (véase, Prevnar 13 Prospecto, Revisión M/2016, pág. 24; www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm201669.pdf), lo que sugiere un intervalo preferido de 1,0-3,0. Cuando se formula una vacuna con más de 13 serotipos, puede ser preferible lograr una relación de 1,5 a 3,0, y se prefiere particularmente emplear una relación de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0. Esta puede ser la relación media para todos los conjugados en una composición, que puede lograrse asegurando que todos los conjugados individuales tengan esta relación, o asegurando que cualquier conjugado fuera de este intervalo en un lado sea equilibrado por un conjugado fuera de este intervalo en el otro lado.

En otra realización, la relación (peso a peso) de polisacárido a proteína portadora mejorada en el conjugado polisacárido-proteína portadora mejorada está entre 0,5 y 4,0 (por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, o aproximadamente 4,0). En otra realización, la relación PS:PC (p/p) en el conjugado de proteína portadora está entre 0,7 y 2,8. En otra realización, la relación PS:PC (p/p) en el conjugado de proteína portadora está entre 1,0 y 2,8. En otra realización, la relación PS:PC (p/p) en el conjugado de proteína portadora es de por lo menos 0,8, por lo menos 0,9, por lo menos 1,0, por lo menos 1,1, por

lo menos 1,2, por lo menos 1,3, por lo menos 1,4 o por lo menos 1,5. En otra realización, la relación entre el polisacárido y la proteína portadora mejorada en el conjugado de polisacárido y proteína portadora mejorada es mayor de 0,9 (p/p). En otra realización, la relación entre el polisacárido y la proteína portadora mejorada en el conjugado de proteína portadora mejorada de polisacárido está entre 0,9 y 3,0 (p/p). El mezclado de conjugados individuales con tales relaciones de PS:PC puede proporcionar una combinación que tenga una relación total deseada de PS:PC.

Presencia de contaminantes (polisacárido libre, C-poli): Un parámetro importante para los conjugados polisacárido-proteína portadora mejorada es el nivel de polisacárido libre que no está conjugado covalentemente con la proteína portadora mejorada, pero que sin embargo está presente en la composición del conjugado. Por ejemplo, en ciertos casos, el polisacárido libre está asociado de manera no covalente (es decir, unido de manera no covalente a, adsorbido a, o atrapado en o con) con el conjugado polisacárido-proteína portadora mejorada. En algunas realizaciones, los conjugados polisacárido-proteína portadora mejorada descritos en la presente comprenden menos de aproximadamente un 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% o 10% de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido. En otra realización, las proteínas portadoras mejoradas con polisacáridos descritas en la presente comprenden menos de aproximadamente un 10% de polisacáridos libres en comparación con la cantidad total de polisacáridos. En otra realización, las proteínas portadoras mejoradas con polisacáridos descritas en la presente comprenden menos de aproximadamente un 25% de polisacáridos libres en comparación con la cantidad total de polisacáridos. En otra realización, las proteínas portadoras mejoradas con polisacáridos descritas en la presente comprenden menos de aproximadamente un 30% de polisacáridos libres en comparación con la cantidad total de polisacáridos. En otra realización, las proteínas portadoras mejoradas con polisacáridos descritas en la presente comprenden menos de aproximadamente un 15% de polisacáridos libres en comparación con la cantidad total de polisacáridos. El polisacárido libre se mide opcionalmente mediante cualquier método adecuado, incluyendo el método de Lei et al. (Dev Biol (Basel). 2000; 103:259-64), que usa un método de precipitación a base de HCl/desoxicolato para distinguir los grupos de polisacáridos. En composiciones preferidas, la cantidad de polisacárido bacteriano no conjugado es de menos del 5%, en peso, de la cantidad total de polisacárido bacteriano en la composición. En una composición con múltiples conjugados neumocócicos, se prefiere que la cantidad de polisacárido bacteriano no conjugado para cada serotipo sea de menos del 5%, en peso, de la cantidad total de polisacárido bacteriano de ese serotipo en la composición.

Un parámetro importante para los conjugados polisacárido capsular neumocócico-proteína portadora mejorada es el nivel de contaminación por C-polisacárido presente en las preparaciones del conjugado. El C-polisacárido es un componente inmunológicamente improductivo, pero altamente inmunogénico de la pared celular de *S. pneumoniae* que "se cuele" en muchos métodos de preparación de polisacáridos capsulares neumocócicos. Como las respuestas inmunitarias al C-polisacárido generalmente no producen anticuerpos neutralizantes, la contaminación con C-polisacárido puede interferir en la evaluación adecuada de la eficacia del conjugado antígeno-proteína portadora mejorada cuando se administra a animales.

El nivel de C-polisacárido se muestra opcionalmente mediante hidrólisis de ácidos total de una preparación de conjugado de polisacárido, cromatografía del hidrolizado y detección conductométrica de colina. Alternativamente, el polisacárido no hidrolizado se analiza mediante NMR para la colina. La técnica de NMR usa la relación entre la señal de colina y la señal de metilo de ramnosa (para polisacáridos capsulares que contienen una ramnosa; una señal diferente para otros polisacáridos capsulares) para calcular el contenido de C-polisacárido. El método cromatográfico usa la relación entre la señal de colina y o el contenido de polisacáridos determinado por el ensayo conductométrico o con uno de los picos de los componentes de polisacáridos capsulares para calcular el contenido de C-polisacáridos. En cualquier método, los estándares de concentraciones conocidas de colina permiten el cálculo directo del nivel de colina presente en una preparación de polisacáridos una vez conocida la concentración de colina, usando la estructura teórica repetida del C-polisacárido [Hermans, et al., Reel. Trav. Chim. Pays-Bas, 107, 600 (1988)], se conoce la concentración de C-polisacárido en una preparación de polisacáridos.

Las concentraciones de polisacáridos de las muestras de conjugados polisacárido-proteína portadora mejorada pueden medirse mediante una variedad de técnicas, por ejemplo, la concentración total de polisacáridos se determina opcionalmente mediante hidrólisis total del polisacárido y medición de la concentración de un monosacárido específico. Comparando la concentración de C-polisacárido con la concentración de polisacárido total, se determina el grado de contaminación por C-polisacáridos (p/p). Los niveles de C-polisacárido por debajo del 3% (p/p) del polisacárido total se consideran aceptables. En algunas realizaciones, los niveles de C-polisacárido se encuentran por debajo del 1%.

La colocación óptima de un antígeno en una proteína portadora para mejorar una respuesta inmunitaria del huésped puede identificarse mediante un método que comprende: i) introducir en una proteína portadora una sustitución nnAA; ii) conjugar un C-polisacárido con el nnAA para formar un glucoconjugado; y iii) medir el peso molecular aparente del glicoconjugado.

Composiciones de conjugados polipéptido-antígeno:

Se proporciona una composición de vacuna que comprende múltiples glicoconjugados de acuerdo con las

reivindicaciones. En algunas realizaciones, la composición de vacuna conjugada de acuerdo con las reivindicaciones provoca una supresión reducida del portador en un sujeto en comparación con una composición de vacuna conjugada que comprende la proteína portadora nativa. En algunas realizaciones, la composición de vacuna conjugada de acuerdo con las reivindicaciones mejora la respuesta inmunitaria global y/o aumenta la respuesta dependiente de células T en un sujeto en comparación con una composición de vacuna conjugada que comprende la proteína portadora nativa.

La composición inmunogénica comprende múltiples conjugados proteína portadora-antígeno (es decir, múltiples serotipos de neumococo). En algunas realizaciones, los múltiples conjugados proteína portadora-antígeno comprenden opcionalmente: (a) múltiples antígenos conjugados con una proteína portadora mejorada común; o (b) antígenos múltiples conjugados con diferentes proteínas portadoras mejoradas. Los múltiples conjugados proteína portadora mejorada-antígeno comprenden antígenos derivados de diferentes serotipos de *S. pneumoniae*). Se prefiere que para cada antígeno se use el mismo tipo de proteína portadora, por ejemplo, cada antígeno se conjuga individualmente con la misma variante de CRM197 que contiene pAMF, y los conjugados antígeno-proteína individuales se combinan a continuación para dar una composición multiantígeno.

En algunas realizaciones, la relación global (peso a peso) de todos los polisacáridos del serotipo con respecto a la proteína portadora (PS:PC) en una composición de conjugado de polisacárido de serotipo multivalente se encuentra en un cierto intervalo. En otra realización, la relación (peso a peso) entre el polisacárido y la proteína portadora mejorada en el conjugado de polisacárido-proteína portadora mejorada (o en la composición multivalente global) está entre 0,5 y 4,0 (por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, o aproximadamente 4,0). En otra realización, la relación PS:PC (p/p) en el conjugado de proteína portadora (o en la composición multivalente global) está entre 0,7 y 2,8. En otra realización, la relación PS:PC (p/p) en el conjugado de proteína portadora (o en la composición multivalente global) está entre 1,0 y 2,8. En otra realización, la relación (p/p) PS:PC en el conjugado de proteína portadora (o en la composición multivalente global) es de por menos 0,8, por lo menos 0,9, por lo menos 1,0, por lo menos 1,1, por lo menos 1,2, por lo menos 1,3, por lo menos 1,4 o por lo menos 1,5 (p/p). En otra realización, la relación entre el polisacárido y la proteína portadora mejorada en el conjugado polisacárido-proteína portadora mejorada (o en la composición multivalente global) es mayor de 0,9 (p/p). En otra realización, la relación entre el polisacárido y la proteína portadora mejorada en el conjugado polisacárido-proteína portadora mejorada (o en la composición multivalente global) está entre aproximadamente 0,9 y aproximadamente 3,0 (p/p). Una composición preferida incluye conjugados proteína-sacárido de polisacáridos capsulares de múltiples serotipos de neumococo con un exceso de masa global de polisacárido con respecto a la proteína, por ejemplo, una relación proteína: polisacárido entre 1:1,1 y 1:2 (p/p), por ejemplo, entre 1:1,5 y 1:1,9.

En algunas realizaciones, el intervalo de peso molecular global de todos los conjugados de polisacárido de serotipo-proteína portadora en una composición de conjugado polisacárido de serotipo-proteína portadora multivalente se encuentra dentro de un intervalo particular. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de aproximadamente 750 kDa, aproximadamente 1.000 kDa, aproximadamente 1.500 kDa, aproximadamente 2.000 kDa, aproximadamente 2.500 kDa, aproximadamente 3.000 kDa, aproximadamente 3.500 kDa, aproximadamente 4.000 kDa, aproximadamente 4.500 kDa, aproximadamente 5.000 kDa, aproximadamente 5.500 kDa, aproximadamente 6.000 kDa, aproximadamente 6.500 kDa, aproximadamente 7.000 kDa, aproximadamente 7.500 kDa, o aproximadamente 8.000 kDa. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de por lo menos aproximadamente 750 kDa, por lo menos aproximadamente 1.000 kDa o por lo menos aproximadamente 1.500 kDa. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de entre aproximadamente 750 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de entre aproximadamente 800 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de entre aproximadamente 850 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de entre aproximadamente 900 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de entre aproximadamente 950 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En algunas realizaciones, los conjugados antígeno-proteína portadora mejorada tienen un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 2.800 kDa.

La composición comprende por lo menos 20 o 21 conjugados proteína portadora-antígeno distintos. En realizaciones adicionales, la composición inmunogénica comprende por lo menos 22, por lo menos 23, por lo menos 24, por lo menos 25, por lo menos 26, por lo menos 27, por lo menos 28, por lo menos 29, o por lo menos 30 conjugados proteína portadora mejorada-antígeno distintos.

En algunos casos podría preferirse que la proteína portadora en cada conjugado sea idéntica. En una realización alternativa de tales composiciones con múltiples conjugados, puede preferirse usar más de un portador. Aunque es posible que cada polisacárido capsular de diferentes serotipos de neumococo pueda conjugarse con un portador diferente, típicamente sólo habría 2-4 (por ejemplo, 2 o 3) portadores diferentes representados entre los conjugados individuales en tales composiciones. A modo de ilustración y no de limitación, en una composición de 24 conjugados diferentes, cada conjugado que comprenda un polisacárido capsular de un serotipo neumocócico diferente, algunos pero no todos los 24 conjugados comprenden una primera proteína portadora y el resto de los 24 conjugados comprenden una segunda proteína portadora, en donde la primera y la segunda proteínas portadoras tienen por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y comprenden por lo menos un epítipo activador de células T y por lo menos dos aminoácidos no naturales (nnAA) que son ácido 2-amino-3-(4-(azidoretíl)fenil)propanoico (pAMF). Así, de nuevo a modo de ejemplo y no de limitación, 12, 13, 15 o 20 de los 24 conjugados podrían comprender la primera proteína portadora, y los 12, 11, 9 o 4, respectivamente, conjugados restantes podrían comprender la segunda proteína portadora.

En algunas realizaciones, el por lo menos un excipiente comprende componentes adecuados para la administración parenteral.

En realizaciones adicionales, el por lo menos un excipiente comprende opcionalmente un tampón o agente de ajuste del pH. En realizaciones particulares, el tampón o agente de ajuste del pH se selecciona del grupo que consiste en borato de sodio, fosfato de sodio, citrato de sodio, sulfato de amonio o succinato, y cualquier combinación de los mismos. Otros ejemplos de tampones adecuados incluyen ácidos como el ácido acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases como hidróxido de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio y tris-hidroximetilaminometano; y tampones como citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio y cloruro de amonio. En las composiciones inmunogénicas también son útiles los tampones de histidina.

En realizaciones adicionales, el por lo menos un excipiente comprende opcionalmente un agente de tonicidad para llevar la osmolalidad de la composición a un intervalo aceptable. En realizaciones particulares, el agente de tonicidad se selecciona del grupo que consiste en cloruro sódico, dextrosa y glicerina, y cualquier combinación de los mismos. Otros ejemplos de tampones adecuados para la administración parenteral incluyen sales que tienen cationes de sodio, potasio o amonio y aniones de cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito; las sales adecuadas incluyen el cloruro potásico, el tiosulfato sódico, el bisulfito sódico y el sulfato amónico.

En realizaciones adicionales, el por lo menos un excipiente comprende opcionalmente un agente tensioactivo (surfactante). En realizaciones particulares, el agente tensioactivo es monolaurato de polioxietilén sorbitán (polisorbato 20 o 'Tween 20'), monooleato de polioxietilén sorbitán (polisorbato 80 o 'Tween 80'), Brij 35, Triton X-10, Pluronic F127, o dodecil sulfato de sodio (SDS). En algunas realizaciones, el agente tensioactivo está presente en una concentración entre el 0,0003% y el 0,3% (p/p).

En algunas realizaciones, el por lo menos un excipiente comprende opcionalmente un adyuvante, un agente que aumenta la estimulación del sistema inmunitario mejorando la presentación del antígeno (formulación de depósito, sistemas de administración) y/o proporcionando señales de coestimulación (inmunomoduladores). En algunas variantes de esta realización, el adyuvante es a base de sal de aluminio. En realizaciones particulares, el adyuvante es fosfato potásico de aluminio, sulfato de hidroxifosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, y cualquier combinación de los mismos. En otras variantes, el adyuvante es una emulsión de aceite en agua. En realizaciones particulares, el adyuvante es AS03, MF59, o AF03, y cualquier combinación de los mismos. En otras variantes más, el adyuvante es un agonista de TLR4. En una realización particular, el adyuvante es RC529. Los adyuvantes preferidos para su uso con la invención son sales de aluminio, como un adyuvante de fosfato de aluminio (por ejemplo, un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio). Cuando una composición incluye un adyuvante de sal de aluminio, se prefiere que la concentración de Al^{3+} en la composición sea de $\leq 1,25$ mg por dosis, por ejemplo, $\leq 1,25$ mg por 0,5 ml, e idealmente $\leq 0,85$ mg por dosis. Los conjugados dentro de una composición pueden adsorberse al adyuvante de sal de aluminio. Para una composición mixta, los conjugados pueden adsorberse a una sal de aluminio individualmente y luego mezclarse, o pueden añadirse a una sal de aluminio para lograr una adsorción secuencial, formando de este modo la composición conjugada mixta.

Una composición preferida comprende (i) múltiples conjugados antígeno-proteína portadora, en donde los múltiples conjugados de antígeno-proteína portadora comprenden por lo menos 20 o 21 conjugados antígeno-proteína portadora distintos, en donde el antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, y en donde:

- (a) el polisacárido capsular de cada conjugado proteína portadora-antígeno distinto es de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae*;
- (b) la proteína portadora de los conjugados proteína portadora-antígeno es un polipéptido que tiene por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y que comprende por lo menos un epítipo activador de células T y por lo menos dos aminoácidos no naturales (nnAA) que son ácido 2-amino-3-(4-(azidometil)fenil)propanoico (pAMF), en donde los polisacáridos capsulares están conjugados con residuos de

pAMF;

(c) hay un conjugado proteína portadora-antígeno distinto para cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 15B, 18C, 19F, 22F, 23F y 33F de *Streptococcus pneumoniae*; y

- 5 (ii) un adyuvante de fosfato de aluminio
 en donde la relación global (peso a peso) entre todos los polisacáridos de serotipo con la proteína portadora
 en la composición es de por lo menos 0,8.

10. Aumento de las respuestas inmunitarias

10 Se proporcionan las composiciones reivindicadas para su uso en la provocación de una respuesta
 inmunoprotectora de anticuerpos contra un antígeno. El conjugado o composición se combinará típicamente con un
 excipiente adecuado para la administración parenteral.

15 La respuesta inmunoprotectora de anticuerpos significa que las composiciones reivindicadas pueden usarse,
 por ejemplo, para proporcionar inmunización activa para la prevención de una enfermedad invasiva provocada por
S.pneumoniae, para la prevención de otitis media provocada por *S.pneumoniae*, o para la prevención de neumonía
 provocada por *S.pneumoniae*.

20 La invención se ilustra en los ejemplos siguientes. Los ejemplos se llevan a cabo usando técnicas bien
 conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, salvo que se describa de otro modo con detalle.

EJEMPLOS

25 **Ejemplo 1:** Síntesis de las fracciones de eCRM de sitio único K11TAG, K25TAG, K34TAG, K38TAG, K40TAG,
 K52TAG, K60TAG, K77TAG, K83TAG, K91TAG, K96TAG y K103TAG

eCRM se expresó en un extracto de síntesis de proteínas libre de células (CFPS) proporcionado por Sutro
 Biopharma, Inc. (South San Francisco, Calif.). Las características y la preparación de dicho extracto se describen en
 30 otras publicaciones; en este caso, el extracto se preparó de manera general como se describe en Zawada et al., 2011,
Biotechnol. Bioeng., 108(7), 1570-1578 con las siguientes modificaciones del documento US2016/0257946: (1) el
 extracto libre de células se preparó a partir de una cepa atenuada RF-1 sensible a OmpT manipulada para que
 sobreexpresase *E. coli* DsbC; (2) el extracto libre de células se preparó a partir de una cepa atenuada RF-1 similar de
 35 *E. coli* atenuada manipulada para que produjese un ARNt ortogonal que codifica CUA para la inserción de un
 aminoácido no natural en un codón de parada ámbar; (3) los extractos libres de células de (1) y (2) se mezclaron
 homogéneamente (en una relación de 85:15) y se trataron con 50 µM de yodoacetamida durante 30 min a RT (20° C);
 y (4) los extractos mezclados homogéneamente se añadieron a una premezcla que contenía todos los demás
 componentes de un sistema de síntesis de proteínas libre de células excepto el ADN que codifica eCRM. La
 concentración final en la reacción de síntesis de proteínas libre de células fue del 30% (en volumen) de extracto celular,
 40 2 mM de para-metilazido-L-fenilalanina (pAMF) (RSP Amino Acids, Shirley, Mass.), 5 µM de ARNt sintetasa específica
 de pAMF ('RS'), 2 mM de GSSG (glutatión oxidado), 8 mM de glutamato magnésico, 10 mM de glutamato amónico,
 130 mM de glutamato potásico, 35 mM de piruvato sódico, 12 mM de AMP, 0,86 mM de cada uno de GMP, UMP y
 CMP, 2 mM de aminoácidos (excepto 0,5 mM de tirosina y fenilalanina), 4 mM de oxalato sódico, 1 mM de putrescina,
 1,5 mM de espermidina, 15 mM de fosfato potásico, 100 nM de T7 RNAP y 2,5 µM del plásmido eCRM que codifica
 45 las variantes de nnAA. Las reacciones de síntesis libre de células se iniciaron con la adición del ADN plasmídico que
 codifica eCRM.

Las reacciones se incubaron 14 h en un agitador a 650 rpm en placas Flower de 48 pocillos (m2p-labs N°
 MTP-48-B). Después del periodo de incubación, la reacción se mantuvo a 4° C hasta que se procesó para su
 50 purificación o análisis. Después de la reacción de síntesis de proteínas libre de células, la mezcla que contenía pAMF-
 eCRM se transfirió a una placa de 96 pocillos (DyNa Block™, 2 ml; Labnet, Edison, N.J.) y se centrifugó a 5000xg
 durante 15 minutos a 40° C.

En primer lugar, se realizó un experimento de optimización para evaluar la mejor temperatura y aditivos para
 55 la producción CFPS de eCRM. Las reacciones de CFPS se realizaron a 30, 25 y 20 grados Celsius, con
 suplementación adicional de ARNt codificante de CUA (0, 1, 2, 4, 8, 12% v/v) y mezcla de nnAA/sintetasa (50, 100,
 150, 200 µg/ml) a cada una de las tres temperaturas. Se recogieron muestras de la mezcla de CFPS antes y después
 de la centrifugación y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE, y las bandas se cuantificaron mediante
 densitometría para evaluar la cantidad de proteína soluble (muestra poscentrifugación) de proteína total (muestra
 60 precentrifugación) producida en cada condición.

La FIG. 1 muestra el rendimiento de nnAA-eCRM producido en cada condición, según se evaluó por
 densitometría cuantitativa. Mientras que las reacciones CFPS a 30 grados produjeron una fracción relativamente
 pequeña de proteína soluble (máx. ~0,33 del total entre todas las condiciones), el rendimiento de proteína soluble
 65 aumentó (>~0,40 soluble/total entre todas las condiciones) a 25 grados y aumentó aún más (>~0,60 soluble/total entre

todas las condiciones) a 20 grados. En ambas condiciones de "baja" temperatura, el rendimiento de proteína soluble mejora aún más aumentando la concentración de ARNt (1-12x muestran un aumento del rendimiento), mientras que aumentar la concentración de nnAA/sintetasa tuvo un efecto perjudicial o nulo sobre el rendimiento soluble.

5 Basándose en el experimento de la FIG. 1, para la síntesis de las variantes K11TAG, K25TAG, K34TAG, K38TAG, K40TAG, K52TAG, K60TAG, K77TAG, K83TAG, K91TAG, K96TAG y K103TAG se eligieron temperaturas menores de 20 grados y una concentración de ARNt de por lo menos 20 μ M.

10 Las reacciones de CFPS se realizaron como se ha indicado anteriormente. Para facilitar la purificación en estos experimentos preliminares, se fusionó una etiqueta de histidina (GSGHHHHHH; SEQ ID NO:10) al extremo C-terminal de la secuencia de la proteína portadora a través del vector de expresión, y la purificación de las variantes de eCRM a partir del sobrenadante poscentrifugación se llevó a cabo usando IMAC Phytips (Phynexus, San Jose, Calif.) que contenía 40 μ l de resina. El lecho de resina se preequilibró en tampón de equilibrio IMAC (1xPBS y 10 mM de imidazol) y el sobrenadante clarificado se pipeteó hacia arriba y hacia abajo 10 veces a través de IMAC Phytips
15 equilibrados a un caudal de 4,2 μ l/min. La proteína unida se lavó con tampón de equilibrio IMAC y luego se eluyó con 125 μ l de tampón de elución IMAC (1xPBS e imidazol 0,5M). La etiqueta de histidina no es esencial y se omite para la purificación a mayor escala.

20 La incorporación de nnAA y la reactividad se evaluaron mediante SDS-PAGE y análisis de fluorescencia después de la reacción con DBCO-fluoresceína (FIG. 2). Se incubaron 2-12 μ M de eCRM con 50 μ M de DBCO-fluoresceína durante 16 horas, se sometieron a SDS-PAGE no reductor y se visualizaron con azul de coomassie (luz visible) y un conjunto de filtros Sypro-ruby (fluorescente, fluoresceína). La FIG. 2 muestra las imágenes de gel de coomassie (izquierda) y fluorescentes (derecha) correspondientes que muestran la capacidad del pAMF incorporado
25 al eCRM para que reaccione con DBCO. Las sustituciones ámbar K25, K34, K38 y K40 muestran una alta eficiencia de expresión y conjugación, mientras que las otras no lo hacen.

Ejemplo 2: Diseño de múltiples eCRM con nnAA

30 Se seleccionaron múltiples variantes de eCRM con nnAA como se describe en la descripción detallada anterior. Las variantes se sintetizaron mediante CFPS y se probaron siguiendo las líneas del Ejemplo 1.

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2: Múltiples variantes de eCRM con nnAA

Nº de Variante	K25	K34	K38	K40	K213	K215	K228	K245	K265	K386	K523	K527
1	✓				✓		✓		✓	✓	✓	
2	✓				✓		✓		✓	✓		✓
3	✓				✓			✓	✓	✓	✓	
4	✓				✓			✓	✓	✓		✓
5	✓					✓	✓		✓	✓	✓	
6	✓					✓	✓		✓	✓		✓
7	✓					✓		✓	✓	✓	✓	
8	✓					✓		✓	✓	✓		✓
9		✓			✓		✓		✓	✓	✓	
10		✓			✓		✓		✓	✓		✓
11		✓			✓			✓	✓	✓	✓	
12		✓			✓			✓	✓	✓		✓
13		✓				✓	✓		✓	✓	✓	
14		✓				✓	✓		✓	✓		✓
15		✓				✓		✓	✓	✓	✓	
16		✓				✓		✓	✓	✓		✓
17			✓		✓		✓		✓	✓	✓	
18			✓		✓		✓		✓	✓		✓
19			✓		✓			✓	✓	✓	✓	
20			✓		✓			✓	✓	✓		✓
21			✓			✓	✓		✓	✓	✓	
22			✓			✓	✓		✓	✓		✓
23			✓			✓		✓	✓	✓	✓	
24			✓			✓		✓	✓	✓		✓
25				✓	✓				✓	✓	✓	
26				✓	✓		✓		✓	✓		✓
27				✓	✓			✓	✓	✓	✓	
28				✓	✓			✓	✓	✓		✓
29				✓		✓	✓		✓	✓	✓	
30				✓		✓	✓		✓	✓		✓
31				✓		✓		✓	✓	✓	✓	
32				✓		✓		✓	✓	✓		✓

Se prepararon variantes adicionales que incluían diferentes números de sustituciones Lys-pAMF. En general, se descubrió que un mayor número de sustituciones proporcionaba portadores que daban lugar a conjugados de MW más alto (por ejemplo, para el serotipo 14, que pasaba de 998 kDa con 2 sustituciones a 1238 kDa con 3 sustituciones, a 1789 kDa con 4 sustituciones y a 2547 kDa con 5 sustituciones), pero los portadores tenían menor solubilidad. En general, los portadores con seis residuos de pAMF proporcionaron tanto una buena solubilidad (>>50 mg/ml) como inmunogenicidad. La alta solubilidad fue sorprendente porque la sustitución de residuos de Lys cargados en la secuencia nativa por residuos de pAMF hidrófobos aumentó la hidrofobicidad de CRM197, que es una proteína de la que ya se ha notificado que su hidrofobicidad afecta a su solubilidad (Orr et al. 1999 *Infect Immun* 67:4290-4). Por tanto, estos resultados demuestran que es posible mantener los mismos sitios de unión que se han usado en conjugados de CRM197 conocidos (concretamente, residuos de Lys) sin provocar insolubilidad cuando se pierden los residuos cargados.

Los estudios sobre CRM197 han identificado epítomos de células T en los residuos P272-D291, V322-G384 y Q412-I458 de la SEQ ID NO:1. Estas regiones epitópicas incluyen los residuos de Lys K420, K441, K446, K448 y K457, por lo que la sustitución de estos residuos de lisina podría alterar los epítomos de células T que sustentan la actividad de CRM197. Los residuos de Lys preferidos para la sustitución por un nnAA en la SEQ ID NO:1 son, por tanto, K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 y K527, como se muestra en la Tabla 2

anterior.

Es deseable que los polisacáridos conjugados no estén localizados demasiado estrechamente en una zona de la superficie de CRM197. Así, dentro de los residuos estrechamente espaciados, se prefiere escoger (i) sólo uno de K25, K34, K38 y K40 y (ii) o K213 o K215. Además, yendo más allá de su estructura primaria, los estudios de la estructura 3D de CRM197 identifican dos regiones generales (la primera que discurre hasta Asn-374 y la segunda que discurre desde Ser-375), por lo que también es preferible escoger residuos en ambas de estas regiones, por ejemplo, para 6 sustituciones, escoger 3 en cada región. Esta orientación general permite separar espacialmente los polisacáridos cuando se unen al portador de CRM197.

Una secuencia que ha resultado especialmente útil para crear conjugados neumocócicos es la variante 12 en la Tabla 2, en la que K34, K213, K245, K265, K386 y K527 se sustituyen por un nnAA. Esta proteína tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9 donde cada X es pAMF (un nnAA preferido). Esta proteína se usa para preparar los conjugados descritos a continuación.

Los residuos de lisina son útiles porque son los aminoácidos que se han usado en conjugados de CRM197 conocidos, por lo que los nnAA en estas posiciones permiten que la conjugación se produzca en los mismos sitios que ya se sabe que son compatibles con CRM197. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la pérdida de lisina cargada puede llevar a cambios estructurales, hidrofobicidad aumentada y menor solubilidad. La modificación de los residuos de fenilalanina a nnAA a base de fenilalanina (como para-azido-Phe, para-azido-metil-Phe, para-fluoro-Phe, para-acetil-Phe o para-benzil-Phe) reduciría el riesgo de estos cambios. Por tanto, los residuos F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 o F532 también se seleccionan para la sustitución, individualmente o en combinación. Se probó la sustitución de hasta cinco residuos de Phe por pAMF y se obtuvieron conjugados solubles, pero con tendencia a conjugados de menor MW que los logrados con el mismo número de sustituciones múltiples de Lys.

En lugar de sustituir aminoácidos dentro de CRM197 también es posible insertar nnAA dentro de la secuencia de CRM197. Por ejemplo, se inserta un codón TAG que codifica pAMF directamente en sentido descendente de los residuos de lisina K34, K213, K245, K265, K386 y K527, ya sea individualmente (para crear seis inserciones puntuales) o en combinación (insertando 2, 3, 4, 5 o 6 nnAA). Los portadores con nnAA insertado, como éstos, son útiles para elaborar los conjugados y composiciones multivalentes como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo de Referencia 3: Identificación de epítomos de células T en Pfs25

Los epítomos activadores de células T de la proteína de superficie específica del ookinete de la malaria Pfs25 se determinan experimentalmente siguiendo los métodos descritos en, por ejemplo, Diethelm-Okita et al., *J Infect Dis.* febrero de 1997; 175(2):382-91. Brevemente, se sintetizan fragmentos peptídicos de 20 aminoácidos y solapados por 5 aminoácidos correspondientes a la secuencia expresada completa de Pfs25. Se obtienen linfocitos humanos de sangre periférica (PBL) empobrecidos en CD8+ y enriquecidos en CD4+ de múltiples sujetos. Los PBL se siembran en placas por triplicado y se cultivan con los péptidos sintéticos individuales que abarcan la secuencia de Pfs25 como estímulos experimentales. La proliferación de los PBL en respuesta a cada fragmento peptídico se mide pulsando los cultivos con [³H]-timidina y se compara entre cultivos provenientes de diferentes individuos. Se identifica que los fragmentos de Pfs25 que estimulan la proliferación comprenden un epítomo de células T. Se clasifica que los fragmentos que estimulan la proliferación de PBL de una pluralidad o de todos los sujetos comprenden un epítomo de células T universal o inmunodominante en Pfs25.

Ejemplo 4: Protocolo general para la activación de polisacáridos con metaperyodato de sodio

Los polisacáridos del serotipo (~30 µmol) se disolvieron en una solución acuosa (HCl 10 mM). A continuación, la solución se calentó a 45° C durante 30 min y después se enfrió, momento en el que se añadió solución de NaOH para ajustar el pH a 6,70. La mezcla de reacción se dializó usando una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa) contra agua de grado HPLC. El sobrenadante se transfirió a un tubo falcon de 50 ml, se añadió tampón de acetato (pH 5,35) a 25 mM y se añadieron 0,5 eq de NaIO₄. La mezcla se agitó a 25° C. durante 17 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se trató opcionalmente con un exceso de borohidruro de sodio (10 eq) y se purificó usando la ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa) contra varios cambios de agua de grado HPLC para dar la solución de polisacárido oxidado.

Ejemplo 5: Procedimiento general para la derivatización de polisacáridos oxidados con peryodato con DBCO

El polisacárido oxidado (~30 µmol) se combinó con DBCO-PEG₄-NH₂ (~30 µmol) o DBCO-NH₂ (~30 µmol) en fosfato sódico 72 mM a pH 6,79 que contenía un 16% de DMSO a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadió solución de cianoborohidruro de sodio (solución de 16 mg/ml en agua, 59,54 µmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante toda la noche 2 días a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se lavó 3x con acetato de etilo, se transfirió a una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa) y se dializó usando 6 intercambios de etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua

para dar una solución del tipo derivado polisacárido-DBCO. A continuación, el derivado polisacárido-DBCO se combinó con sacarosa a 10:1 (p/p) y se liofilizó para proporcionar un polvo blanco que se usará en la siguiente reacción de conjugación.

5 **Ejemplo 6: Protocolo general de activación de polisacáridos con CDAP**

Se disolvió el polisacárido capsular (30 mg) (PS 3) en una solución acuosa (13,5 ml de H₂O con 1,5 ml de ácido acético 2M). La mezcla se calentó a 85° C durante 1 hora y se añadió un exceso de cloruro de magnesio a partir de una solución 1M después de enfriar a temperatura ambiente. El polisacárido resultante se purificó usando diálisis centrífuga con MWCO de 30 kDa de Amicon usando 6 intercambios de agua.

A continuación, el polisacárido preparado se disolvió en agua con pH 7,0 y se añadió el reactivo de cianilación CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio, en acetonitrilo). A continuación, se ajustó la solución a pH 9,5 o se añadió trimetilamina (2,5 eq). A continuación, se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ o DBCO-NH₂ a la solución. La solución se ajustó al 5% de DMSO y se agitó durante la noche a 25° C. La solución se lavó 3x con 20 ml de acetato de etilo y se purificó usando unidades de diálisis Amicon con MWCO de 30 kDa usando 7 intercambios con 3% de DMSO, 20% de etanol, 0,9% de cloruro sódico y 3 intercambios con agua. El derivado polisacárido-DBCO se combinó luego a 10:1 (p/p) con sacarosa y se liofilizó.

20 **Ejemplo 7: Procedimiento general de conjugación de polisacárido-DBCO con eCRM**

La muestra de polisacárido-DBCO liofilizada y combinada con sacarosa 10:1 p/p (preparada por el procedimiento de los ejemplos 4 o 5) se disolvió en NaCl al 0,9% y se mezcló con eCRM en solución para proporcionar una relación de masa de entrada PS:eCRM de 1:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La reacción de clic se inactivó mediante la adición de un exceso de solución de azida sódica. La mezcla de PS-eCRM conjugado se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, MWCO de 300K) y luego se dializó contra 5 intercambios de solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas. La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para proporcionar una solución de conjugado PS-eCRM.

Ejemplo 8: Preparación de conjugados del serotipo 1 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

35 **1. Oxidación**

Pureza de la PS de tipo 1: 80% (urónica)
Peso molecular: 625 g mol⁻¹ (por unidad de repetición)

Procedimiento de reacción:

El polisacárido nativo (19,7 mg, corregido al 80%, 15,8 mg, 25,2 µmol) se disolvió en 9,85 ml de solución acuosa (7,0 ml de agua y 2,85 ml de tampón de acetato, 200 mM, pH 5,5). A esta solución se le añadieron 300 µl de solución de peryodato sódico (104 µg, 3,78 µmol, 0,15 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas, después de lo cual se añadió un exceso molar grande de borohidruro de sodio (10 mol. eq). El PS oxidado se purificó usando diálisis centrífuga Amicon con MWCO de 30 kDa usando por lo menos 6 intercambios con agua para dar la solución PS-1 purificada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 1 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo urónico (µM)	% de Oxidación (BCA)	% de Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.15	19.7	2.86	11040	1.4	n/d	100	N/A

2. Derivatización de DBCO

55 **Procedimiento de reacción:**

Se disolvió PS1-OX (15,8 mg, 25,2 µmol) en tampón de fosfato (3,6 ml, 50 mM pH 7,0) al que se añadió éster DBCO-PEG₄-NHS (1,0 eq., 649,1 g mol⁻¹ en DMSO, 0,35 ml). La mezcla de la reacción se agitó a 37°C durante dos días en un baño de agua con termostato seguido de extracción con acetato de etilo (3x20 ml). El derivado de DBCO se purificó mediante unidades de diálisis centrífuga (Amicon MWCO de 30 kDa) usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado tipo 1 de DBCO. A esta solución (2,20 ml, 9,59 mg) se le añadió una solución de sacarosa (96 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en tres porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 3,18 mg de 1 DBCO y 32 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS oxidada 1(mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo urónico (μM)	derivatización de DBCO 309 nm Abs	derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS- DBCO (%)	SEC-MALS kDa
15.8	2.20	6976	0.280 x 4	116.16	1.67	65	602

3. Conjugación del derivado PS 1-DBCO con eCRM

PS 1-DBCO: 3,18 mg (con 32 mg de sacarosa) polvo liofilizado

% de DBCO: 1,67

Concentración de CRM: solución de 6,5 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 1:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió 1-DBCO en solución de eCRM funcionalizada con azido(0,51 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada de PS1:CRM de 1:1 (p/p). Para mitigar la formación de gel fue necesaria una dilución adicional con solución de cloruro sódico al 0,9% (filtrado de 0,22 μm) hasta 1,0 mg ml⁻¹. La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20°C) durante 18 horas. La reacción de clic se inactivó mediante la adición de una solución de azida sódica (10 mg/ml, 50 μl). El conjugado de CRM se transfirió a dos tubos de diálisis prelavados (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para dar una solución de conjugado 1-CRM.

PS 1-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/m)	Recuperación de CRM (%)	Relación CJD* PS:CRM	PS Libre (%)	SEC-MALS MDa
3.18	3.315	7.17	0.177	40	0.099	21	1.79 : 1	9.39	2.13

*CJD = conjugado dializado

Ejemplo 9: Preparación de conjugados del serotipo 2 de PS neumocócico para un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 2: 80%.

Peso mol: 960,84 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

El polisacárido nativo (25,5 mg, 26,5 μmol) se disolvió en 12,75 ml de solución acuosa (9,24 ml de agua y 3,51 ml de tampón de acetato, 200 mM, pH 5,5). A esta solución se añadieron 216 μl de solución de peryodato sódico (5,26 mg/ml, 0,20 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas con monitorización por absorción UV a 222 nm para NaIO₄. El PS oxidado se purificó mediante diálisis centrífuga Amicon con MWCO de 100 kDa usando por lo menos 6 intercambios con agua para dar una solución de PS-2 purificada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 2 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (μM)	%de Oxidación (BCA)	% de Oxidación (ensayo de aldehídos)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.20	25.5	2.28	9041	22.8	5.4	78	N/A

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

Se diluyó PS2-OX (18,1 mg, 18,8 μmol) en 2,14 ml de agua con tampón de fosfato (1,95 ml, 200 mM pH 6,0) al que se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (9,85 mg, 1 eq., en DMSO, 0,197 ml). Después de 25 minutos se añadió NaCNBH₃ (2,36 mg, 2 eq. 59 μl de una solución en H₂O). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante dos días en un baño de agua con termostato seguido de la adición de tampón de fosfato (0,5 ml de 200 mM pH=6). A esto se añadió NaBH₄

(60 µl de una solución acuosa de 10 mg/ml, 1 eq.) Después de agitar durante 30 min la mezcla se extrajo con acetato de etilo (4x5 ml). El acetato de etilo residual se eliminó burbujeando con gas nitrógeno y la mezcla se transfirió a filtros de centrifuga Amicon con MWCO de 100 kDa. El derivado de DBCO se purificó mediante diálisis centrífuga usando 1 intercambio de agua seguido de 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el tipo 2 de derivado de DBCO. A esta solución (2,14 ml, 14,3 mg) se le añadió una solución de sacarosa (100 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en tres porciones casi iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco (4,96 mg, 4,96 mg y 4,4 mg).

PS oxidado 2(mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (µM)	derivatización de DBCO 309 nm Abs	derivatización de DBCO (µM)	incorporación de DBCO (%)	rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
18.1	2.14	1956	0.848 x 4	315.5	4.03	89	375

3. Conjugación del derivado PS 2-DBCO con eCRM

PS 2-DBCO: 4,4 mg (con 32 mg de sacarosa) polvo liofilizado

% de DBCO: 4,03

Concentración de CRM: 3,18 mg/ml de solución

S:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió PS2-DBCO en NaCl al 0,9% (3,01 ml) y se añadió DMSO (0,44 ml). A continuación, se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,95 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada de PS2:CRM de 1,5:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La reacción de clic se inactivó añadiendo una solución de azida sódica (10 mg/ml, 100 µl). El conjugado de CRM se transfirió a dos tubos de diálisis prelavados (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 24 horas (5 intercambios, 1000 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 2-CRM.

PS 2-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	recuperación de CRM (%)	CJD relación PS : CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
4.4	2.93	4.77	0.683	91	0.387	75	1.76 : 1	LLOQ	1.37

Ejemplo 10: Preparación de conjugados del serotipo 3 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Hidrólisis

Pureza del PS de tipo 3: 86% (antrona)

Peso mol.: 360,3 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

El polisacárido nativo 3 (30,0 mg) se disolvió en 15,0 ml de solución acuosa (13,5 ml de agua y 1,5 ml de ácido acético, 2M). La mezcla se calentó a 85° C durante 1 hora, después de lo cual se añadió solución de cloruro de magnesio (1,5 ml, 1 M) después de enfriarla a temperatura ambiente. El PS hidrolizado se purificó usando diálisis centrífuga Amicon con MWCO de 30 kDa usando por lo menos 6 intercambios con agua para dar una solución de PS-3 purificada que luego se liofilizó en dos alícuotas iguales.

PS 3 (mg)	Agua (ml)	AcOH, 2M (ml)	Ensayo de antrona (µM)	Rendimiento de PS (%)	MALS (kDa)
30.0	13.5	1.50	10477.22	85	294

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

El PS3 hidrolizado (12,75 mg, 35,4 µmol) se disolvió en agua (6,4 ml) ajustada a pH 7,0 con solución de

hidróxido de sodio (0,2M, 100 µl). A continuación, se añadió gota a gota el reactivo de cianilación, CDAP (0,426M en acetonitrilo, 0,2 eq., 16,7 µl). Después de 90 s, la solución se ajustó rápidamente a pH 9,5 con solución de hidróxido de sodio (0,2M, 300 µl). Se añadió inmediatamente, gota a gota, DBCO-PEG₄-NH₂ (0,032M en DMSO, 0,1 eq., 523 g mol⁻¹, 0,110 ml). Se añadió DMSO adicional para obtener DMSO al 5% (v/v) (0,320 ml). La mezcla de la reacción se agitó a 25°C durante una noche en un baño de agua con termostato seguido de filtración a través de un filtro de jeringuilla PES de 0,22 µm. El filtrado se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml). El derivado de DBCO se purificó mediante unidades de diálisis centrífuga (Amicon con MWCO de 30 kDa) usando un total de 7 intercambios con DMSO al 3%, etanol al 20% en agua, cloruro sódico al 0,9% seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el tipo 3 de derivado de DBCO. A continuación, la solución acuosa se filtró a través de un filtro de jeringuilla de PVDF de 0,45 µm. A esta solución (3,84 ml, 8,52 mg) se añadió un exceso de masa 10 veces mayor de sacarosa (85 mg en 0,85 ml de agua). La solución combinada se dividió en tres porciones que se liofilizaron para obtener tres muestras de polvo blanco. Dos muestras contenían 5,0 mg de 3-DBCO y 50 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación, con 8,5 mg en la muestra restante, para un total de tres.

PS 3 hidrolizado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS- DBCO (%)	SEC-MALS kDa
12.8	4.04	2063.47	1.095 x 3	102.64	5.0	70	409

3. Conjugación del derivado PS 3-DBCO con eCRM

PS 3-DBCO: 5,0 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo liofilizado
 % de DBCO: 5,0
 Concentración de CRM: Solución de 4,0 mg/ml
 PS:CRM (relación de entrada): 1:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió 3-DBCO en solución de cloruro sódico al 0,9% (6,39 ml, filtrado de 0,22 µm), tampón de fosfato (pH 7,0, 0,5M, 0,333 ml) y DMSO (0,833 ml). Se añadió gota a gota solución de eCRM funcionalizada con azido (0,770 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada PS3:CRM de 1:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La reacción de clic se inactivó mediante la adición de una solución de azida sódica (10 mg/ml, 50 µl). El conjugado de CRM se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (4 intercambios, 1 L cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para proporcionar una solución de conjugado 3-CRM.

PS 3- DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	Relación CJF* PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.0	5.0	3.63	0.402	70	0.423	74	0.95 : 1	2.55	3.2

*CJF = conjugado dializado v filtrado

Ejemplo 11: Preparación de conjugados del serotipo 3 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 3: 86% (antrona)
 Peso mol.: 360,3 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

Se disolvió el polisacárido nativo 3 (14,4 mg, corregido al 86%, 12,4 mg, 34,4 µmoles) en 7,2 ml de solución acuosa (5,9 ml de agua y 1,3 ml de tampón de acetato, 200 mM, pH 5,5). A esta solución se añadieron 300 µl de solución de peryodato sódico (1,10 mg, 5,16 µmol, 0,15 eq.). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas. El PS oxidado se purificó usando diálisis centrífuga Amicon con MWCO de 30 kDa usando por lo menos 6 intercambios con agua para dar la solución de PS3-OX purificada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 3 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	ensayo Antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	% de Oxidación (ensayo de aldehído)	rendimiento de PS (%)
0.15	14.4	1.84	15940.33	3.9	0.8	73

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

Se disolvió PS3-OX (9,05 mg, 25,1 μmol) en tampón de fosfato (2,11 ml, 50 mM, pH 6,7) al que se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 eq., 523 g mol⁻¹ en DMSO, 0,40 ml). La mezcla de la reacción se agitó a 25°C durante 25 minutos antes de añadir una solución de cianoborohidruro de sodio (2 eq., 44,5 mg/ml, 35 μl) y se agitó durante dos días. En este tiempo, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml). El derivado de DBCO se purificó mediante unidades de diálisis centrífuga (Amicon MWCO de 30 kDa) usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el tipo de derivado de DBCO 3. A esta solución (3,20 ml, 8,60 mg) se le añadió un exceso de masa 10 veces mayor de sacarosa (86 mg en 0,86 ml de agua). La solución combinada se dividió en cuatro porciones y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Tres muestras contenían 2,0 mg de 3-DBCO y 20 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación, con 2,6 mg en la muestra restante, para un total de cuatro.

PS oxidado 3(mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (μM)	derivatización de DBCO 309 nm Abs	derivatización de DBCO (μM)	incorporación de DBCO (%)	rendimiento de PS- DBCO (%)	SEC-MALS kDa
15.8	2.76	2681.28	0.683 x 3	64.47	2.3	95	304

3. Conjugación del derivado PS 3-DBCO con eCRM

PS 3-DBCO: 2,0 mg (con 20 mg de sacarosa) polvo liofilizado

% de DBCO: 2,3

Concentración de CRM: Solución de 4,0 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 1:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió 3-DBCO en solución de cloruro sódico al 0,9% (0,400 ml, filtrado de 0,22 μm) y DMSO (0,100 ml). Se añadió gota a gota solución de eCRM funcionalizada con azido (0,330 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada de PS3:CRM de 1:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 48 horas. La reacción de clic se inactivó añadiendo una solución de azida sódica (10 mg/ml, 50 μl). El conjugado de CRM se transfirió a dos tubos de diálisis prelavados (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (4 intercambios, 1 L cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 3-CRM.

PS 3- DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	recuperación de CRM (%)	relación CJF PS : CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
2.0	2.0	3.63	0.226	41	0.307	59	0.74 : 1	21.0	3.42

Ejemplo 12: Preparación de conjugados del serotipo 4 de PS neumocócico para un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 4: 80% (antrona)

Peso mol.: 825,78

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS tipo 4 (27,5 mg, 33,30 μmol) en 13,75 ml de solución acuosa (12,38 ml de agua y 1,37 ml de HCl 0,1 M). La solución se calentó a 45° C durante 30 min y se enfrió, momento en el que se añadió solución de NaOH (0,1 M, 1,37 ml) para ajustar el pH a 6,70. La mezcla de la reacción se dializó usando una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) mediante 3 intercambios con agua de grado HPLC (12 ml cada uno). El sobrenadante se transfirió a un tubo falcon de 50 ml con 9,84 ml de agua. A esta solución se añadieron 3,43 ml de tampón de acetato 200 mM (pH 5,35) y 632 μl de solución de NaIO_4 (3,56 mg, 16,65 μmol , 0,5 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 17 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando la ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución de PS-4 oxidada.

Eq Mol de NaIO_4	mg de PS 4	Vol. después de purificación ml	Antrona μM	% de oxidación (BCA)	%de oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.5	27.5	2.71	12078	10.8	2.58	101

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 4 oxidada (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (24,58 mg, 29,77 μmol , 2,4 ml de agua) se añadió una solución tampón (1,8 ml de solución tampón de fosfato 200 mM, pH=6,79), DMSO (0,6 ml) y una solución de DBCO-PEG-4- NH_2 (15 mg en 200 μl de DMSO; 28,65 μmol , 9,6 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 224 μl de una solución de cianoborohidruro de sodio (5,0 mg en 300 μl de agua; 59,54 μmol , 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 μl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 225 μl de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/ μl , 10 equivalentes) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml de acetato de etilo) y luego se transfirió a una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y luego se dializó usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar una solución de tipo 4 de derivado de DBCO. A esta solución (4,75 ml, 15,25 mg) se añadió una solución de sacarosa (153 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en tres porciones y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Dos muestras contenían 5,35 mg de 4 DBCO y 54 mg de sacarosa y una muestra contenía 4,55 mg de 4 DBCO y 45 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

mg de PS 4 oxidado	Vol. después de purificación ml	Antrona μM	derivatización de DBCO 309 nm Abs	derivatización de DBCO μM	% de DBCO (%)	rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
24.58	5.25	3897	0.472x3	137.16	3.52	69	343

3. Conjugación del derivado PS 4-DBCO con eCRM

PS 4-DBCO: 5,35 mg (con 54 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 3,52
 Concentración de CRM: Solución de 4 mg/ml
 PS : CRM (relación de entrada): 1.20:1

Procedimiento de reacción:

La muestra de DBCO de tipo 4 (5,35 mg de polvo blanco con 54 mg de sacarosa) se disolvió en 0,67 ml de solución de NaCl al 0,9% y, a continuación, se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,74 ml). Después de 10 min, se añadió otra porción de eCRM funcionalizado con azido (0,37 ml) proporcionando una relación de masa de PS4:CRM de 1,20:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 2 días. La mezcla PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (5 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm , 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado PS-CRM de tipo 4.

PS 4-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.35	4.46	5.31	0.595	65	0.360	45	1.65:1	23.63	4.55

Ejemplo 13: Preparación de conjugados del serotipo 5 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 5: 89% (ácido urónico)

Peso mol.: 919,32

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS tipo 5 (22,8 mg, 24,36 μ mol) en 8,26 ml de agua y 3,14 ml de tampón de acetato 200 mM (pH 5,26) y 163 μ l de solución de NaIO_4 (1,3 mg, 6,1 μ mol, 0,25 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando la ultracentrífuga AMICON (MWCO de 100 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución de PS-5 oxidada.

Eq Mol de NaIO_4	PS 5 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ácido urónico (μ M)	% de Oxidación (BCA)	% de Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.25	22.8	2.44	6735.97	84.87	5.71	68

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 5 oxidada (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (6,25 mg, 6,68 μ mol, 0,992 ml de agua) se añadió solución tampón (0,063 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH=6,74), DMSO (25 μ l) y una solución de DBCO-PEG-4- NH_2 (3,5 mg en 100 μ l de DMSO; 6,68 μ mol, 10 equivalentes) todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 37° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 84 μ l de una solución de cianoborohidruro de sodio (0,84 mg en 84 μ l de agua; 13,36 μ mol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 24 h a 37° C. La mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (6x10 ml). El extracto se transfirió a un filtro de ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y después se dializó mediante 8 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado de DBCO tipo 5. A esta solución (5,35 ml, 6,0 mg) se añadió una solución de sacarosa (60 mg en 0,6 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar dos muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 3,0 mg de 5 DBCO y 30 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 5 oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ácido urónico (μ M)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μ M)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
6.25	5.38	1219.4	0.688x3	63.044	5.17	98	300

3. Conjugación del derivado PS 5-DBCO con eCRM

PS 5-DBCO: 3,0 mg (con 30 mg de sacarosa) polvo blanco

% de DBCO: 5,17

Concentración de CRM: Solución de 3,25 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 1:1

Procedimiento de reacción:

El derivado 5-DBCO (3,0 mg de polvo blanco con 30 mg de sacarosa) se disolvió en solución de cloruro sódico al 0,9% (4,48 ml) y DMSO (0,6 ml). Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,92 ml)

proporcionando una relación de masa de PS5:CRM de 1:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente antes de agitar suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 5 horas. Se añadió solución de azida sódica (20 µl, 10 mg/ml en agua). Después de 30 min, la mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 24 horas (5 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para dar solución conjugada 5 PS-CRM.

PS 5-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ácido urónico (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	Relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
3.0	3.0	5.466	0.231	46	0.239	48	0.97	LLOQ	2.74

Ejemplo 14: Preparación de conjugados de PS neumocócica serotipo 6A con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Tipo 6A PS Peso mol.: 706
Solución de NaIO₄ en agua (10 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-6A (15 mg, 21,2 µmol) en 7,5 ml de solución acuosa (solución de acetato sódico 10 mM, PH 4,5). A esta solución se le añadieron 36,3 µl de solución de NaIO₄ (0,363 mg, 1,69 µmol, 0,08 eq). La mezcla se agitó a 4°C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235057, 20K MWCO) y luego se dializó con tampón PB de 50 mm, PH 6,8 durante 24 horas (4 intercambios, 600 ml cada uno) para dar solución de PS-6A oxidada. Después de la diálisis, se añade DMSO para hacer PS-6A en 10% DMSO con 50 mm de tampón PB, PH 6.8.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 6A (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% Oxidación (BCA)	Rendimiento de PS (%)
0.08	15	4	4780	9.0	90

2. Derivatización de DBCO

Concentración final de PS: 3,37 mg/ml,
Concentración final del tampón: 10% DMSO en 50 mM PB (pH 6,8)

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 6A oxidado (13,5 mg, 19,1 µmol, 4 ml en DMSO al 10%, 50 mM de PB, PH 6,8), se le añadió a 25° C una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (10,01 mg en 100,1 µl de DMSO; 19,1 µmol, 10 equivalentes). A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 60 min, transcurridos los cuales se añadió una solución de cianoborohidruro de sodio (1,2 mg en 120 µl de agua; 19,1 µmol, 10 equivalentes) y se continuó agitando durante 24 horas a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235057, 20K MWCO) y se dializó usando 4 intercambios con etanol al 20% en tampón de PB 50 mM seguido de 3 intercambios con tampón de PB 50 mM para dar el derivado de DBCO tipo 6A.

PS 6A oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC- MALS kDa
13.5	8	1685	148	8.78	70	193

3. Conjugación del derivado PS 6A-DBCO con eCRM

PS 6A-DBCO: 7,1 mg (con 71 mg de sacarosa) polvo blanco
DBCO: 9%.

Concentración de CRM: solución de 2,617 mg/ml
 PS:CRM (relación de entrada): 2:1
 Concentración final de PS: 5,2 mg/ml

5 Procedimiento de reacción:

Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (1,4 ml) al derivado 6A DBCO (7,1 mg de polvo blanco con 71 mg de sacarosa) proporcionando una relación de masa de PS 6A:CRM de 2:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (23° C) durante 17 horas. A continuación, la mezcla se introdujo en una incubadora (37° C) durante 3 horas. Después de la reacción, la mezcla se diluyó 2 veces con solución de cloruro sódico al 0,9% y se redujo con borohidruro de sodio (1,9 mg en 191 µl de agua; 50,2 µmol, 50 equivalentes) durante 3 horas. La mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235072, 300K MWCO) y luego se dializó con PBS, PH 7 durante 24 horas (3 intercambios, 1000 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para proporcionar una solución de conjugado PS 6A-CRM.

PS 6A- DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC- MALS MDa
7.1	3.6	10	0.424	60	0.170	47	2.5 : 1	16.1	1.15

Ejemplo 15: Preparación de conjugados del serotipo 6B de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 6B: 80% (antrona)
 Peso mol.: 706,18
 Solución de NaIO₄ en agua (5,45 mg/ml)

35 Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-6B (27,28 mg corregidos al 80%, 21,82 mg, 30,9 µmol) en 14 ml de solución acuosa (9,5 ml de agua y 4,5 ml de tampón de acetato 0,2 M; pH=5,5). A esta solución se le añadieron 145 µl de solución de NaIO₄ (0,79 mg, 3,71 µmol, 0,12 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando el dispositivo ultracentrífugo AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución oxidada de PS-6B.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 6B (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% de Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.12	27.28	3.54	7783	8.1	7.33	89

2. Derivatización de DBCO

Concentración final de PS: 3,5 mg/ml
 Concentración final del tampón: 53 µM (pH 6,0)

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 6B oxidada (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (18,4 mg, 27,6 µmol, 3,35 ml de agua) se añadió solución tampón (1,4 ml de solución tampón de fosfato 200 mM, pH=6,01), DMSO (700 µl) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (14,43 mg en 295 µl de DMSO; 27,6 µmol, 10 equivalente), todo ello a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 75 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (9,39 mg en 200 µl de agua, 55,6 µmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 µl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 104 µl de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/µl, 10 equivalentes) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml de acetato de etilo) y luego se transfirió a una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y luego se dializó usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar una solución de tipo el derivado 6B DBCO. A esta solución (2,96 ml, 20,1 mg) se le añadió una solución de sacarosa (200 mg en 1 ml de agua). La

solución combinada se dividió en tres porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 6,7 mg de 6B DBCO y 67 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 6B oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS KDa
18.4	3.11	9620	0.796 x 4	311.17	3.2	115	403

3. Conjugación del derivado PS 6B-DBCO con eCRM

PS 6B-DBCO: 6,7 mg (con 67 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 3,2
 Concentración de CRM: solución de 2,617 mg/ml
 PS:CRM (relación de entrada): 2:1
 Concentración final de PS: 5,23 mg/ml

Procedimiento de reacción:

Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (1,28 ml) al derivado 6B-DBCO (6,70 mg de polvo blanco con 67 mg de sacarosa) proporcionando una relación de masa PS6B:CRM de 2:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 17 horas. A continuación, la mezcla se introdujo en un horno (37° C) durante 2 horas. La mezcla PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235071, 100K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm , 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 6B PS-CRM.

PS 6B-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	Relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
6.70	3.35	6.18	0.68	67	0.347	67	1.96 : 1	8.72	1.30

Ejemplo 16: Preparación de conjugados del serotipo 7F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Activación con CDAP y reticulación DBCO

Pureza PS 7F: n.d. % (antrona)-supuesto 100
 Peso mol.: 1227 g mol⁻¹ (unidad de repetición)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió PS7F (6,2 mg, 5,1 μmol) en agua (3,1 ml) a la que se añadió CDAP (2,0 eq., 100 mg/ml en acetonitrilo, 24 μl). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente (RT) durante 30 s. En ese momento, se añadió trietilamina (TEA, 2,5 eq., 0,2M, 63 μl) y la mezcla de la reacción se agitó durante 120 s. Se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 eq., 28,7 μmol /ml en DMSO, 180 μl) junto con tampón borato (0,1M, pH8,5, 1,0 ml) y se agitó a RT durante toda la noche. El PS7F derivatizado con DBCO se purificó por precipitación con etanol y por diálisis centrífuga (Amicon MWCO de 100 kDa) usando 3 intercambios con agua. Después del análisis por espectroscopia de absorbancia UV, ensayo de antrona y SEC, esta solución (3,61 ml, 3,05 mg) se diluyó con una solución de sacarosa (10 veces el contenido en masa, 100 mg/ml) y se liofilizó hasta obtener un polvo blanco.

PS 7F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
6.2	3.61	686.3	0.619	55.52	8.1	49	n.d.

2. Conjugación del derivado PS 7F-DBCO con eCRM

PS 7F-DBCO: 2,62 mg (con 26,2 mg de sacarosa) polvo liofilizado
 % de DBCO: 8,1
 CRM: 5,0 mg/ml en tampón PBS
 PS:CRM (relación de masa de entrada): 1.73:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió 7F-DBCO liofilizado en salmuera (0,9% (p/v), 0,938 ml), tampón de fosfato (0,5 M, pH 7,0, 58 µl) y DMSO (144 µl) a lo que se añadió solución de eCRM (0,300 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada PS7F:CRM de 1,73:1,00 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 17 horas. El conjugado de CRM se transfirió a dos tubos de diálisis prelavados (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró estéril a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 7F-CRM.

PS 7F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	relación CJF PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
2.62	1.5	7.17	0.450	65	0.224	2.0 : 1.0	LLOQ (<21,4ug/ml)	1.95

Ejemplo 17: Preparación de conjugados del serotipo 8 de PS neumocócico para un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 8 84
 Peso mol.: 684,54 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

Se disolvió el polisacárido nativo (42 mg, 61,3 µmol) en 21 ml de solución acuosa (14,7 ml de agua y 6,3 ml de tampón de acetato, 200 mM, pH 5,5). A esta solución se añadió una solución de peryodato sódico (calculada en 2,63 mg, 0,20 eq.). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas con monitorización por absorción UV a 222 nm para NaIO₄. El PS oxidado se purificó mediante diálisis centrífuga Amicon con MWCO de 30 kDa usando por lo menos 6 intercambios con agua para dar una solución de PS-8 purificada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 8 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% de Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.20	42	3.26	15724	8.96	2.28	84

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

Se diluyó PS8-OX (33,8 mg, 49,4 µmol) en 3,14 ml de agua con tampón de fosfato (789 µl, 0,5 M pH 6,0), 1 ml de H₂O y DMSO (313 µl) al que se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (25 mg, 1 eq., en DMSO, 250 µl). Después de 10 minutos se añadió NaCNBH₃ (6,2 mg, 2 eq. añadiendo 132 µl de 9,43 mg en 200 µl de H₂O). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante dos días en un baño de agua con termostato seguido de la adición de tampón de fosfato (0,5 ml de 200 mM pH=6). A esto se añadió NaBH₄ (1 eq.). Después de agitar durante 30 min, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3x5 ml). El acetato de etilo residual se eliminó burbujando con gas nitrógeno y la mezcla se transfirió a filtros de centrífuga Amicon de MWCO de 100 kDa. El derivado de DBCO se purificó mediante diálisis centrífuga usando 6 intercambios con EtOH al 20% y 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado de DBCO de tipo 8. A esta solución (5,63 ml, 25 mg) se añadió una solución de sacarosa y se liofilizó.

PS oxidado 8(mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
33.8	5.63	6492	0.813x3	232	3.57	74	392

3. Conjugación del derivado PS 8-DBCO con eCRM

PS 8-DBCO: 3,77 mg (con 38 mg de sacarosa) polvo liofilizado
 % de DBCO: 3,57
 Concentración de CRM: 5,966 mg/ml de solución
 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió PS8-DBCO en NaCl al 0,9% (2,28 ml), se añadió tampón de fosfato (0,126 ml, 0,5 M pH 7,0) y DMSO (0,314 ml). A continuación, se añadió la solución eCRM funcionalizada con azido (0,42 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada de PS8:CRM de 1,5:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 1 hora y después se puso en el horno a 37° C durante la noche. La reacción de clic se inactivó mediante la adición de una solución de azida sódica (10 mg/ml, 100 μl). El conjugado de CRM se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 1000 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución conjugada de 8-CRM.

PS 8-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	Relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
3.77	2.51	7.13	0.372	70	0.237	67	1.57 : 1	11.53	1.2

Ejemplo 18: Preparación de conjugados del serotipo 9N de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 9N: 75%.
 Peso mol.: 928,29 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

Se disolvió el polisacárido nativo (19,0 mg, 20,4 μmol) en 9,49 ml de solución acuosa (7,12 ml de agua y 2,37 ml de tampón de acetato, 200 mM, pH 5,5). A esta solución se añadió una solución de peryodato sódico (1,31 mg, 0,30 eq., 56 μl de una solución acuosa de 23,65 mg en 1,0 ml). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas con monitorización por absorción UV a 222 nm para NaIO₄. El PS oxidado se purificó mediante diálisis centrífuga Amicon de MWCO de 30 kDa usando 4 intercambios con agua para dar una solución de PS-9 purificada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 9N (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	% de Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.30	19.0	1.643	9229	7.0	N.D.	71

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

Se diluyó PS9N-OX (12,6 mg, 13,6 μmol) en 1,643 ml de agua con tampón de fosfato (0,945 ml, 200 mM pH 6,0 que contenía 94,5 mg de sacarosa) y DMSO (0,33 ml) a lo que se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (7,2 mg, 1 eq., en

DMSO, 0,142 ml). Después de 10 minutos se añadió NaCNBH₃ (1,71 mg, 2 eq. añadiendo 47 µl de 7,36 mg en 200 µl de H₂O). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante dos días en un baño de agua con termostato seguido de la adición de tampón de fosfato (0,4 ml de 200 mM pH=6). A esto se añadió NaBH₄ (0,51 mg, 1 eq.) Después de agitar durante 30 min la mezcla se extrajo con acetato de etilo (5x5 ml). El acetato de etilo residual se eliminó burbujeando con gas nitrógeno y la mezcla se transfirió a filtros de centrifuga Amicon con MWCO de 30 kDa. El derivado de DBCO se purificó mediante diálisis centrífuga usando 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) seguido de 6 intercambios con etanol acuoso al 20% (12 ml cada uno) y finalmente 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el tipo de derivado 9N-DBCO. A esta solución (2,388 ml, 9,05 mg) se le añadió una solución de sacarosa y se liofilizó.

PS oxidado 9N(mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
12.6	2.388	1485	0.782	72.8	4.9	78	474

3. Conjugación del derivado PS 9N-DBCO con eCRM

PS 9N-DBCO: 4,5 mg (con 45 mg de sacarosa) polvo liofilizado
% de DBCO: 4,9
Concentración de CRM: Solución de 3,0 mg/ml
PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió PS9N-DBCO en NaCl al 0,9% (1,30 ml) junto con tampón de fosfato de pH=7 (96 µl de 0,5 M) y se añadió DMSO (0,24 ml). A continuación, se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,60 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada de PS:CRM de 1,5:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La reacción de clic se inactivó añadiendo una solución de azida sódica (10 mg/ml, 100 µl). El conjugado de CRM se transfirió a dos tubos de diálisis prelavados (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% con 3 ml de tampón pH=7 añadido a la misma, durante 24 horas (7 intercambios, 1000 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para proporcionar una solución de conjugado 9N-CRM.

PS 9N-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
4.5	3.0	5.28	0.77	90	0.407	72	1.89 : 1	10.9	1.17

Ejemplo 19: Preparación de conjugados del serotipo 9V de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 9V: 85% (antrona)
Peso Molecular: 704 kDa (Unidad de Repetición=971,8 g/mol)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS de tipo 9V (35,90 mg, 37,80 µmol) en 17,95 ml de solución acuosa (12,565 ml de agua y 5,385 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH 5,5) en un tubo de muestra de poliestireno de 50 ml con barra de agitación. Una vez que el PS se hubo solubilizado, se añadieron 852 µl de solución de NaIO₄ (2,83 mg, 13,23 µmol, 0,35 mol eq.). El tubo de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un baño de agua a 24°C. La mezcla se agitó a 24°C. Después de 18 h, la mezcla de la reacción se dializó usando tres dispositivos de filtro centrífugo AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml) mediante 4 intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para obtener una solución oxidada de PS-9V.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 9V (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.35	35.90	4.55	5213.14	9.06	7.30	64

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 9V oxidado (21,64 mg, 22,78 μ mol, 4,27 ml), se añadió solución tampón (0,541 ml de tampón de fosfato 0,5 M pH 6,0), DMSO (66 μ l) y una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (11,9 mg en 475 μ l de DMSO; 22,78 μ mol, 1 mol eq.). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 140 μ l de una solución de cianoborohidruro de sodio (2,86 mg en 140 μ l de agua; 45,56 μ mol, 2 mol eq.). La mezcla de la reacción se envolvió en papel de aluminio y se continuó agitando en un baño de agua a 25°C durante 2 días. La reacción se detuvo el segundo día mediante la adición de 163 μ l de una solución de borohidruro de sodio (1,72 mg en 163 μ l de agua; 45,56 μ mol, 2 mol eq.). Después de agitar durante 30 minutos (cuando había cesado el burbujeo observable), la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (2x10 ml) seguido de diclorometano (2x10 ml). El extracto se burbujeó con N₂ durante 20 minutos para eliminar el diclorometano residual y luego se transfirió a 2 dispositivos de filtración centrífuga AMICON® Ultra-15 (MWCO de 50 kDa; 15 ml). La diálisis se realizó realizando tres intercambios con una solución de DMSO al 3% (15 ml cada uno), tres intercambios con una solución de etanol al 20% (15 ml cada uno) y dos intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para dar el derivado DBCO 9V. A esta solución (4,40 ml, 12,144 mg) se añadió una solución de sacarosa (121,44 mg 1,214 ml de agua). Esta solución combinada se dividió en tres fracciones (2x5 mg y 1x2,14 mg) y cada una se liofilizó para dar un polvo fino blanco. Todas las fracciones se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron para la reacción de conjugación.

PS 9V oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μ M)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
21.6	4.40	949.00	0.341	28.00	3.0	56	267

3. Conjugación del derivado PS 9V-DBCO con eCRM

PS 9V-DBCO: 5 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 3,0
 Concentración de CRM: 6,009 mg/ml de solución
 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

El derivado 9V DBCO (5,0 mg de polvo blanco con 50 mg de sacarosa) se disolvió en solución de cloruro sódico al 0,9% (0,881 ml), tampón de fosfato pH 7 (0,067 ml, 0,5 M) y DMSO (0,167 ml). Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (solución de 0,555 ml) proporcionando una relación de masa PS9V:CRM de 1,5:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas y después durante 2 horas adicionales a 37° C. Después del tiempo total de reacción, se añadió un volumen de azida sódica a la mezcla de conjugación (0,33 mg; 5,15 μ mol). A continuación, la mezcla de la reacción se diluyó con solución de cloruro sódico al 0,9% (2,83 ml) y se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO). La muestra se sometió a diálisis en solución de cloruro sódico al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μ m, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado PS-CRM de 9V.

PS 9V-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.0	3.33	1.67	0.86	87	0.450	68	1.9	14.2	0.94

Ejemplo 20: Preparación de conjugados del serotipo 9V de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del tipo 9V PS: 81% (antrona)
 Peso mol.: 949,83
 Solución de NaIO₄ en agua (5,41 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-9V (21,15 mg corregidos al 81%, 17,13 mg, 18,04 μmol) en 10,57 ml de solución acuosa (7,4 ml de agua y 3,17 ml de tampón de acetato 0,2 M; pH=5,5). A esta solución se le añadieron 214 μl de solución de NaIO_4 (1,16 mg, 5,41 μmol , 0,3 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 20 horas. La muestra oxidada se purificó mediante un filtro de ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) usando 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución oxidada de PS-9V.

Eq Mol de NaIO_4	PS 9V (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.30	21.15	2.49	7352	7.4	9.6	82

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 9V oxidada (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (15,36 mg, 16,17 μmol , 2,20 ml de agua) se añadió solución tampón (1,4 ml de solución tampón de fosfato 200 mM, pH=6,01), DMSO (500 μl) y una solución de DBCO-PEG-4- NH_2 (8,46 mg en 131 μl de DMSO; 16,17 μmol , 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 41 μl de una solución de cianoborohidruro de sodio (15,5 mg en 200 μl de agua, 32,34 μmol , 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 μl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 62 μl de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/ μl , 10 equivalentes) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml). El extracto se transfirió a un filtro de ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y después se dializó mediante 6 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado de tipo 9V DBCO. A esta solución (4,0 ml, 10,08 mg) se añadió una solución de sacarosa (100 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 5,04 mg de 9V DBCO y 50 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 9V oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
15.36	5.42	2642	0.216 x 4	90.32	3.42	89	324

3. Conjugación del derivado de PS 9V-DBCO con eCRM

PS 9V-DBCO: 5,04 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 3,42
 Concentración de CRM: 3,923 mg/ml de solución
 PS:CRM (relación de entrada): 1.11:1

Procedimiento de reacción:

Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (CRM en solución de 0,1,156 ml) al derivado 9V DBCO (5,04 mg de polvo blanco con 50 mg de sacarosa) proporcionando una relación de masa de PS9V:CRM de 1,11:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (5 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm , 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 9V PS-CRM.

PS 9V-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.04	4.53	5.73	0.61	69	0.298	39	2.05:1	14.64	1.26

Ejemplo 21: Preparación de conjugados del serotipo 10A de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Activación con CDAP y reticulación de DBCO

Pureza de PS 10A: 77% (antrona)
Peso mol.: 1227 g mol⁻¹ (unidad de repetición)

5 Procedimiento de reacción:

Se disolvió PS10A (18,7 mg, 15,2 µmol) en agua (7,9 ml) a la que se añadió CDAP (0,8 eq., 100 mg/ml en acetonitrilo, 30 µl). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente (RT) durante 30 s. En ese momento, se añadió solución de hidróxido de sodio (0,2 M, 200 µl) para alcanzar un pH de 9,5 y la mezcla de la reacción se agitó durante 150 s. A continuación, se añadió DMSO (1,2 ml), seguido de DBCO-PEG₄-NH₂ (0,5 eq., 32,0 µmol/ml en DMSO, 238 µl) y se agitó a RT durante toda la noche. El PS10A derivatizado con DBCO se purificó mediante extracción con solvente y mediante diálisis centrífuga (Amicon MWCO de 30 kDa) usando 3 intercambios de DMSO al 3% (v/v), 2 intercambios con salmuera al 0,9% (v/v) y 3 intercambios con agua. Después del análisis por espectroscopia de absorbanza UV, ensayo de antrona y SEC, esta solución (3,18 ml, 13,5 mg) se diluyó con una solución de sacarosa (10 veces el contenido en masa, 100 mg/ml) y se liofilizó hasta obtener un polvo blanco.

PS 10A (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
18.7	3.18	1150.41	1.081	101.26	8.8	72	579

2. Conjugación del derivado PS 10A-DBCO con eCRM

PS 10A-DBCO: 5,00 mg (con 50,0 mg de sacarosa) polvo liofilizado
% de DBCO: 8,8
CRM: 5,0 mg/ml en tampón PBS
PS:CRM (relación de masa de entrada): 1.75:1

Procedimiento de reacción:

El 10A-DBCO liofilizado se disolvió en salmuera (0,9% (p/v), 3,759 ml), tampón de fosfato (0,5 M, pH 7,0, 200 µl) y DMSO (500 µl) a lo que se añadió solución de eCRM (0,541 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada de PS10A:CRM de 1,75:1,00 (p/v). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 17 horas. El conjugado de CRM se transfirió a dos tubos de diálisis prelavados (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró estéril a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución conjugada 10A-CRM.

PS 10A-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.00	2.86	6.86	0.678	93	0.311	2.18:1.0	5.64	1.048

Ejemplo 22: Preparación de conjugados del serotipo 11A de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Hidrólisis

Pureza del tipo 11A PS: 69% (antrona)
Peso mol.: 908,7 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

El polisacárido nativo 11A (35,0 mg) se disolvió en 17,5 ml de solución acuosa (15,75 ml de agua y 1,75 ml de ácido acético, 2M). La mezcla se calentó a 80° C durante 1 hora, transcurrida la cual se añadió solución de hidróxido de sodio a pH 5,5 (3,2 ml, 1M) después de enfriar a temperatura ambiente. El PS hidrolizado se purificó usando diálisis centrífuga Amicon con MWCO de 30 kDa usando por lo menos 6 intercambios con agua para dar una solución purificada de PS-3 que luego se liofilizó como una alícuota.

PS 11A (mg)	Agua (ml)	AcOH, 2M (ml)	Ensayo de antrona	Rendimiento de PS (%)	MALS (kDa)
35.0	15.75	1.75	6294.58	85	461

2. Oxidación

Procedimiento de reacción:

A la solución de polisacárido hidrolizado (5,027 ml, 28,75 mg, 31,6 μ moles) se le añadió además agua (5,75 ml) y tampón de acetato (0,2M, pH 5,5, 3,6 ml). A esta solución se añadieron gota a gota 135 μ l de solución de peryodato sódico (1,35 mg, 6,32 μ mol, 0,20 eq.). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas. El PS oxidado se purificó usando diálisis centrífuga Amicon de 100 k Da MWCO usando por lo menos 6 intercambios con agua para dar la solución PS-11A-OX purificada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 11A (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.20	28.75	2.42	9525.39	10.2	4.82	73

3. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

Se añadió PS11A-OX (22,0 mg, 24,2 μ mol, 2,235 ml) a tampón de fosfato (1,37 ml, 200 mM, pH 6,0) al que se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 eq., 523 g mol⁻¹ en DMSO, 100 mg/ml, 127 μ l) y una cantidad adicional de DMSO (560 μ l). La mezcla de la reacción se agitó a 25°C durante 25 minutos antes de añadir una solución de cianoborohidruro de sodio (2 eq., 44,5 mg/ml, 68 μ l) y se agitó durante dos días. La mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml) y se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 μ m. El derivado de DBCO se purificó mediante unidades de diálisis centrífuga (Amicon MWCO de 100 kDa) usando 7 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el tipo de derivado 11A-DBCO. A esta solución (2,535 ml, 15,00 mg) se añadió una solución de sacarosa (150 mg en 1,5 ml de agua). La solución combinada se dividió en tres porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 5,00 mg de 11A-DBCO y 50 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 11A hidrolizado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μ M)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
22.0	3.44	1628.30	1.000 x 4	93.93	5.77	93	543

4. Conjugación del derivado de PS 11A-DBCO con eCRM

PS 11A-DBCO: 5,0 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo liofilizado
 % de DBCO: 5,77
 Concentración de CRM: 5,42 mg/ml de solución
 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió 11A-DBCO en solución de cloruro sódico al 0,9% (7,656 ml, filtrado de 0,22 μ m), tampón de fosfato (pH 7,0, 0,5M, 0,385 ml) y DMSO (0,962 ml). Se añadió gota a gota la solución eCRM funcionalizada con azido (5,42 mg/ml, 0,617 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada de PS11A:CRM de 1,5:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 17 horas. La reacción de clic se inactivó mediante la adición de una solución de azida sódica (10 mg/ml, 50 μ l). El conjugado de CRM se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (4 intercambios, 1 L cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 μ m, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 11A-CRM.

PS 11A-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.0	3.33	9.14	0.454	83	0.271	74	1.68:1	0.92	0.987

Ejemplo 23: Preparación de conjugados del serotipo 12F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 12F: 82% (antrona)

Peso mol.: 1094 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS tipo 12F (21,8 mg, 20 µmol) en 10,9 ml de solución acuosa (8,175 ml de agua y 2,725 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH 5,5) en un tubo de muestra de poliestireno de 50 ml con barra agitadora. Una vez se hubo solubilizado el PS, se añadieron 160 µl de solución de NaIO₄ (0,64 mg, 3 µmol, 0,15 mol. eq.). El tubo de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un baño de agua a 25°C. La mezcla se agitó a 25°C. Después de 18 h, la mezcla de la reacción se dializó usando dos dispositivos de filtro centrífugo AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml) mediante 6 intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para dar una solución oxidada de PS-12F.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 12F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.15	21.8	3.06	4462.11	37	5.62	69

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

Se añadió PS12F-OX (13,1 mg, 12 µmol, 2,68 ml) a tampón de fosfato (1,00 ml, 200 mM, pH 6,0) al que se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 eq., 523 g mol⁻¹ en DMSO, 33 mg/ml, 199 µl) y una cantidad adicional de DMSO (500 µl). La mezcla de la reacción se agitó a 25°C durante 25 minutos antes de añadir una solución de cianoborohidruro de sodio (2 eq., 52,5 mg/ml, 29 µl) y se agitó durante dos días. La mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml) y el solvente se liberó por burbujeo. El derivado de DBCO se purificó mediante unidades de diálisis de centrifuga dos veces (Amicon MWCO de 30 kDa) usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua cada vez (12 ml cada uno) para dar el derivado 12F-DBCO. A esta solución (2,2 ml, 10,45 mg) se añadió una solución de sacarosa (104,5 mg en 1,05 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para proporcionar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 5,0 mg de 12F-DBCO y 50 mg de sacarosa para su uso en la reacción de conjugación.

PS 12F-OX (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
13.1	2.20	1447.92	0.302 x 3	28.2	2.0	80	544

3. Conjugación del derivado de PS 12F-DBCO con eCRM

PS 12F-DBCO: 5,0 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo liofilizado

% de DBCO: 2,0%

Concentración de CRM: 5,29 mg/ml de solución

PS:CRM (relación de entrada): 1,5:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió 12F-DBCO en solución de cloruro sódico al 0,9% (6,542 ml, filtrado de 0,22 µm), tampón de fosfato (pH 7,0, 0,5M, 0,334 ml) y DMSO (0,834 ml). Se añadió gota a gota la solución de eCRM funcionalizada con azido (5,29 mg/ml, 0,630 ml) para proporcionar una relación de entrada de PS12F:CRM de 1,5:1 (p/p). La solución se mezcló

muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 17 horas. La reacción de clic se inactivó añadiendo una solución de azida sódica (10 mg/ml, 50 µl). El conjugado de CRM se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (4 intercambios, 1 L cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución estéril de conjugado 12F-CRM.

PS 12F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.0	3.33	8.06	0.547	88	0.200	48	2.73:1	13.3	0.931

Ejemplo 24: Preparación de conjugados del serotipo 14 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 14: 91% (Antrona)
 Peso mol: 689,25
 Solución de NaIO₄ en agua (7,8 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-14 (28,3 mg corregidos al 80%, 25,75 mg, 37,36 µmol) en 14 ml de solución acuosa (10 ml de agua y 4 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH=5,5). A esta solución se añadieron 110 µl de solución de NaIO₄ (0,86 mg, 4,05 µmol, 0,13 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 3 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando ultracentrifuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución oxidada de PS-14.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 14 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.13	28.3	3.042	10189	6.59	3.67	83

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 14 oxidada (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (20,5 mg, 29,74 µmol, 2,92 ml de agua) se añadió una solución tampón (1,3 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH=6.8), DMSO (550 µl) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (11,68 mg en 150 µl de DMSO; 22,3 µmol, 0,75 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 70 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (6,39 mg en 120 µl de agua, 59,48 µmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 µl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 100 µl de solución de borohidruro de sodio (1,13 mg 10 equiv) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml de acetato de etilo) y luego se transfirió a una ultracentrifuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y luego se dializó usando 7 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado de DBCO tipo 14. A esta solución (3,78 ml, 17,7 mg) se añadió una solución de sacarosa (177 mg en 1,17 ml de agua). La solución combinada se dividió en tres porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 5,9 mg de 14 DBCO y 59 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 14 oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
20.5	3.91	1694.06	0.622 x 4	238	3.51	91	463

3. Conjugación del derivado de PS 14-DBCO con eCRM

PS 6B-DBCO: 5,9 mg (con 59 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 3,5

Concentración de CRM: 5,06 mg/ml de solución
PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

Al derivado de DBCO 14 (5,9 mg de polvo blanco con 59 mg de sacarosa) se le añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,779 ml) proporcionando una relación de masa de PS14:CRM de 1,5:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La mezcla PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235071, 100K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución conjugada de 14 PS-CRM.

PS 14-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.9	3.94	4.27	0.648	93	0.283	61	2.29:1	5.29	0.925

Ejemplo 25: Preparación de conjugados del serotipo 14 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 14: 91% (Antrona)
Peso mol.: 689,25
Solución de NaIO₄ en agua (10,19 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-14 (23,5 mg corregidos al 80%, 21,38 mg, 31,02 µmol) en 11,75 ml de solución acuosa (8,2 ml de agua y 3,55 ml de tampón de acetato 0,2 M; pH=5,5). A esta solución se añadieron 97 µl de solución de NaIO₄ (0,95 mg, 4,03 µmol, 0,13 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución oxidada de PS-14.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 14 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.13	23.5	3.76	5994	6.60	2.28	73	N/A

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 14 oxidada (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (14,3 mg, 20,75 µmol, 3,46 ml de agua) se añadió una solución tampón (1,3 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH=6.8), DMSO (637 µl) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (10,86 mg en 263 µl de DMSO; 20,75 µmol, 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 51 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (10,2 mg en 200 µl de agua, 41,50 µmol, 20 equiv) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 µl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 78 µl de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/µl, 10 equiv) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml de acetato de etilo) y después se transfirió a una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y después se dializó usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado de DBCO tipo 14. A esta solución (4.12 ml, 12.24 mg) se añadió una solución de sacarosa (12 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en tres porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 6,12 mg de 14 DBCO y 6 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 14 oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)
14.3	4.43	4307	0.621 x 3	190.14	4.42	92

3. Conjugación del derivado PS 14-DBCO con eCRM

PS 6B-DBCO: 6,12 mg (con 62 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 4,42
 Concentración de CRM: solución de 2,617 mg/ml
 PS:CRM (relación de entrada): 1.8:1

Procedimiento de reacción:

Al derivado de DBCO 14 (6,12 mg de polvo blanco con 62 mg de sacarosa) se le añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (1,3 ml) proporcionando una relación de masa PS14:CRM de 1,8:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20°C) durante 17 horas. La mezcla PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235071, 100K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada (1,5 ml) se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución conjugada de 14 PS-CRM.

PS 14-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa	N° de Lote
6.12	3.4	4.85	1.24	98	0.472	67	2.63:1	3.48	2.5	CJD
6.12	3.4	2.31	0.24		0.094		2.55:1	N/A	1.56	CJF

Ejemplo 26: Preparación de conjugados del serotipo 15B de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 15B: 71% (antrona)
 Peso Mol.: 1185 kDa (Unidad de Repetición=1069,80 g/mol)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS tipo 15B (14,6 mg, 13,65 µmol) en 7,30 ml de solución acuosa (5,1 ml de agua y 2,2 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH 5,5) en un tubo de muestra de poliestireno de 50 ml con barra agitadora. Una vez se hubo solubilizado el PS, se añadieron 160 µl de solución de NaIO₄ (0,59 mg, 2,75 µmol, 0,20 mol eq.). El tubo de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un baño de agua para agitar a 24°C. Después de 3,5 horas, la mezcla de la reacción se dializó usando un dispositivo de filtro centrífugo AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml) mediante 6 intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para obtener una solución oxidada de PS-15B.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 15B (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.20	14.6	1.521	5560.34	27.01	9.52	62

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS oxidado tipo 15B (7,56 mg, 7,07 µmol, 1,271 ml), se añadió solución tampón (0,640 ml de tampón de fosfato 0,5 M pH 6,0), DMSO (0,063 ml) y una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (17 mg en 221 µl de DMSO; 7,07 µmol, 1 mol eq.). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 350 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (0,90 mg en 350 µl de agua, 2 mol eq.). La mezcla de la reacción se envolvió en papel de aluminio y se continuó agitando en un baño de agua ajustado a 25°C durante 2 días. La reacción se detuvo el segundo día mediante la adición de 163 µl de una solución de borohidruro de sodio (0,27 mg; 7,07 µmol, 2 mol eq.). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de la reacción se extrajo con diclorometano (3x15 ml). El extracto se burbujeó con N₂ durante 20 minutos para eliminar el diclorometano residual y después se transfirió a un dispositivo de filtración centrífuga AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml). La diálisis se realizó realizando tres intercambios con una solución de DMSO al 3% (15 ml cada uno), tres intercambios con una solución de etanol al 20% (15 ml) y tres intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para dar el derivado 15B de DBCO. A esta solución (1,982 ml, 6,86 mg) se añadió una solución de sacarosa (68,6 mg en 0,686 ml de agua). Esta

solución combinada se dividió en dos fracciones y cada una se liofilizó para dar un polvo fino y blanco. Hasta que se necesitaron para la reacción de conjugación todas las fracciones se almacenaron a 4° C después de liofilizarlas hasta la sequedad.

PS 15B oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
7.56	1.982	1122.13	0.732	66.71	5.9	91	n/a

3. Conjugación del derivado de PS 15B-DBCO con eCRM

PS 15B-DBCO: 3,85 mg (con 38,5 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 5,9
 Concentración de CRM: 6,009 mg/ml de solución
 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

El derivado 15B DBCO (3,85 mg de polvo blanco con 38,5 mg de sacarosa) se disolvió en solución de cloruro sódico al 0,9% (4,302 ml), tampón de fosfato pH 7 (0,220 ml, 0,5 M) y DMSO (0,550 ml). Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (solución de 0,467 ml) proporcionando una relación de masa PS15B:CRM de 1,5:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20°C) durante 18 horas y después durante 2 horas adicionales a 37°C. La reacción de conjugación se terminó con la adición de azida sódica (0,23 mg; 3,60 μmol). A continuación, la mezcla de la reacción se diluyó con solución de cloruro sódico al 0,9% hasta un volumen final de 7 ml y se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO). La muestra se sometió a diálisis en solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para obtener la solución conjugada 15B PS-CRM.

PS 15B-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
3.85	2.57	7.52	0.515	100	0.289	85	1.8:1	7.68	2.40

Ejemplo 27: Preparación de conjugados del serotipo 17F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 17F: 84% (Antrona)
 Peso Mol: 1274 kDa (Unidad de Repetición=1203,00 g/mol)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS del tipo 17F (28,50 mg, 23,69 μmol) en 14,25 ml de solución acuosa (9,925 ml de agua y 4,275 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH 5,5) en un tubo de muestra de poliestireno de 50 ml con barra de agitación. Una vez se hubo solubilizado el PS, se añadieron 53,8 μl de solución de NaIO₄ (0,65 mg, 3,03 μmol, 0,128 mol eq.). El tubo de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un baño de agua para agitar a 24°C. Después de 1 hora, la mezcla de la reacción se dializó usando dos dispositivos de filtro centrífugo AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml) mediante 5 intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para dar una solución de PS-17F oxidada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 17F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.128	28.50	2.63	7378.81	12.60	6.81	82

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 17F oxidado (22,0 mg, 18,29 μ mol, 2,48 ml), se añadió solución tampón (1,31 ml de tampón de fosfato 0,5 M pH 6,0), y una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (9,58 mg en 95,8 μ l de DMSO; 18,29 μ mol, 1 mol eq.). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadió solución de cianoborohidruro de sodio (2,30 mg en 200 μ l de agua, 36,60 μ mol; 2 mol eq.). La mezcla de la reacción se envolvió en papel de aluminio y se continuó agitando en un baño de agua ajustado a 25° C durante 2 días. La reacción se detuvo el segundo día mediante la adición de solución de borohidruro de sodio (0,48 mg; 18,29 μ mol, 1 mol eq.). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de la reacción se extrajo con diclorometano (3x15 ml). El extracto se burbujeó con N₂ durante 20 minutos para eliminar el diclorometano residual y después se transfirió a un dispositivo de filtro de centrifuga AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml). La diálisis se realizó realizando cinco intercambios con una solución de etanol al 20% (15 ml) y tres intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para dar el derivado de DBCO 17F. A esta solución (3,27 ml, 11,58 mg) se añadió una solución de sacarosa (115,8 mg en 1,158 ml de agua). Esta solución combinada se dividió en tres fracciones (2x5 mg; 1x1,58 mg) y cada una se liofilizó para obtener un polvo blanco fino. Hasta que se necesitaron para la reacción de conjugación todas las fracciones se almacenaron a 4°C una vez se hubieron liofilizado hasta la sequedad.

PS 17F oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μ M)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
22	4.40	978.16	0.350	30.45	3.1	53	209

3. Conjugación del derivado de PS 17F-DBCO con eCRM

PS 17F-DBCO: 5 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 3,1
 Concentración de CRM: 5,996 mg/ml de solución
 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

El derivado 17F DBCO (5 mg de polvo blanco con 50 mg de sacarosa) se disolvió en solución de cloruro sódico al 0,9% (3,742 ml), tampón de fosfato pH 7 (0,200 ml, 0,5 M) y DMSO (0,500 ml). Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,558 ml de solución) proporcionando una relación de masa PS17F:CRM de 1,5:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20°C) durante 19 horas. La reacción de conjugación se terminó con la adición de azida sódica (0,27 mg; 4,16 μ mol; 1 mol eq.). A continuación, la mezcla de la reacción se diluyó con solución de cloruro sódico al 0,9% hasta un volumen final de 8 ml y se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO). La muestra se sometió a diálisis en solución de cloruro sódico al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μ m, 33 mm de polietersulfona) para obtener la solución de conjugado 17F PS-CRM.

PS 17F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5	3.33	6.71	461.30	99	0.349	70	1.59:1	9.41	1.072

Ejemplo 28: Preparación de conjugados del serotipo 18C de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 18C: 72% (antrona)
 Peso mol: 970,76
 Solución de NaIO₄ en agua (5,41 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS de tipo 18C (61 mg, 62,84 μ mol) en 30,5 ml de solución acuosa (27,45 ml de agua y 3,05 ml de ácido acético 2 M). A continuación, la solución se calentó a 95°C durante 40 min y se enfrió, momento en el que se añadió solución de NaOH (1 N, 5,2 ml) para ajustar el pH a 6,0. La mezcla de la reacción se dializó usando una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 100 kDa 6-12 ml) mediante 3 intercambios con agua de grado HPLC (12 ml cada uno). El sobrenadante se transfirió a un tubo falcon de 50 ml con 12,4 ml de agua. A esta solución se añadieron 5,15 ml de agua y 5,8 ml de tampón de acetato 200 mM (pH 5,35) y 153 μ l de solución de NaIO₄ (1,53 mg, 7,175 μ mol,

0,15 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 3 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando ultracentrífuga AMICON (MWCO de 100 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución de PS-18C oxidada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 18C (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.15	61	5.29	6480.2	4.84	7.1	55

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS del tipo 18C oxidado (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (10,0 mg, 10,3 μmol, 1,55 ml de agua) se añadió una solución tampón (0,211 ml de solución tampón de fosfato 200 mM, pH=6,74), DMSO (141 μl) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (5,4 mg en 54 μl de DMSO; 16,17 μmol, 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 130 μl de una solución de cianoborohidruro de sodio (1,3 mg en 130 L de agua, 20,6 μmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 37°C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 μl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 80 μl de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/μl, 10 equiv) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con diclorometano (2x10 ml) seguido de acetato de etilo (10 ml). El extracto se transfirió a un filtro de ultracentrífuga AMICON (MWCO de 100 kDa 6-12 ml) y después se dializó mediante 4 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar tipo el derivado 18C DBCO. A esta solución (1,31 ml, 7,0 mg) se le añadió una solución de sacarosa (70 mg en 0,7 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar dos muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 3,5 mg de 18C DBCO y 35 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 18C oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
10.0	1.52	5469.4	1.031 x 3	291	5.32	81	203

3. Conjugación del derivado de PS 18C-DBCO con eCRM

PS 18C-DBCO: 3,5 mg (con 35 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 5,32
 Concentración de CRM: solución de 2,76 mg/ml
 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió el derivado 18C DBCO (3,5 mg de polvo blanco con 35 mg de sacarosa) en solución de cloruro sódico al 0,9% (0,661 ml), tampón de fosfato pH 7 (0,07 ml, 0,5 M) y DMSO (0,175 ml). Se añadió la solución de eCRM funcionalizada con azido (0,844 ml de solución) proporcionando una relación de masa PS18C:CRM de 1,5:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 2 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se diluyó con solución de cloruro sódico al 0,9% (0,661 ml), tampón de fosfato pH 7 (0,07 ml, 0,5 M) y DMSO (0,175 ml) para hacer que la concentración final de PS-18 fuese de 1 mg/ml y se dejó reaccionar durante 18 horas. Se añadió solución de azida sódica (23 μl, 10 mg/ml en agua). Después de 30 min, la mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO) y, a continuación, se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 18C PS-CRM.

PS 18C-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
3.5	2.33	4.11	0.287	34	0.168	29.6	1.7	13.7	1.97

Ejemplo 29: Preparación de conjugados del serotipo 18C de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Tipo 18C PS Unidad de repetición Peso mol.: 1012
Solución de NaIO₄ en agua (10 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-18C (20 mg, 19,76 µmol) en 3 ml de solución acuosa (solución de acetato sódico 10 mM, PH 4,5). A esta solución se añadieron 63,4 µl de solución de NaIO₄ (0,634 mg, 2,96 µmol, 0,15 eq). La mezcla se agitó a 23°C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235057, 20K MWCO) y luego se dializó con tampón PB de 50 mM, PH 6,8 durante 24 horas (4 intercambios, 600 ml cada uno) para dar solución de PS-18C oxidada. Después de la diálisis, se añade DMSO para obtener PS-18C en DMSO al 10% con 50 mM de tampón PB, PH 6.8.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 18C (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	Rendimiento de PS (%)
0.15	20	4	3705	7.05	75

2. Derivatización de DBCO

Concentración final de PS: 3,75 mg/ml,
Concentración final del tampón: 10% DMSO en 50 mM PB (pH 6,8)

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 18C oxidado (15 mg, 14,8 µmol, 4,4 ml en 10% DMSO 50 mM PB, PH 6,8), se añadió una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (7,76 mg en 77,6 µl de DMSO; 14,8 µmol 10 equivalentes) a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 60 min, transcurridos los cuales se añadió una solución de cianoborohidruro de sodio (0,93 mg en 93 µl de agua; 14,8 µmol, 10 equivalentes) y se continuó agitando durante 24 horas a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235057, 20K MWCO) y luego se dializó usando 4 intercambios con etanol al 20% en tampón PB 50 mM seguido de 3 intercambios con tampón PB 50 mM para dar tipo el derivado DBCO 18C.

PS 18C oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
15	5	2460.4	75.12	3.05	83	350

3. Conjugación del derivado PS 18C-DBCO con eCRM

PS 18C-DBCO: 6 mg (con 60 mg de sacarosa) polvo blanco
DBCO: 3%
Concentración de eCRM: 6,5 mg/ml
PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1
Concentración final de PS: 2 mg/ml

Procedimiento de reacción:

Al derivado 18C DBCO (6 mg de polvo blanco predisoluto en 3 ml de agua, 5,9 µmol) se le añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,615 ml) proporcionando una relación de masa de PS 18C:CRM de 1,5:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (23° C) durante 17 horas. A continuación, la mezcla se introdujo en una incubadora (37° C) durante 3 horas. Después de la reacción, la mezcla se diluyó 2 veces con solución de cloruro sódico al 0,9% y se redujo con borohidruro de sodio (1,12 mg en 112 µl de agua; 29,64 µmol, 50 equivalentes) durante 3 horas. La mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrum Lab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235072, 300K MWCO) y luego se dializó con PBS, PH 7 durante 24 horas (3 intercambios, 1000 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,45 µm y 0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 18C PS-CRM.

PS 18C-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
6	4	10	0.42	70	0.15	2.65:1	14.80	8.25

Ejemplo 30: Preparación de conjugados del serotipo 19A de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 19A: 90% (antrona)

Peso mol.: 614,44

Solución de NaIO₄ en agua (5,69 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-19A (22,10 mg corregidos al 90%, 19,89 mg, 32,37 μ mol) en 11,05 ml de solución acuosa (7,73 ml de agua y 3,32 ml de tampón de acetato 0,2 M; pH=5,5). A esta solución se añadieron 304 μ l de solución de NaIO₄ (1,73 mg, 8,09 μ mol, 0,25 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (10 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución oxidada de PS-19A.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 19A (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.25	22.10	2.72	11148	11.5	6.1	99.39

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS del tipo 19A oxidado (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (17,14 mg, 27,9 μ mol, 2,50 ml de agua) se añadió una solución tampón (1,0 ml de solución tampón de fosfato 200 mM, pH=6.01), DMSO (0,4 ml) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (14,61 mg en 190 μ l de DMSO; 27,9 μ mol, 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 70,2 μ l de una solución de cianoborohidruro de sodio (15,6 mg en 313 μ l de agua; 55,8 μ mol, 20 equiv) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 μ l de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 105 μ l de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/ μ l, 10 equiv) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml de acetato de etilo) y después se transfirió a una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y después se dializó usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado tipo 19A DBCO. A esta solución (3,12 ml, 11,4 mg) se añadió una solución de sacarosa (114 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar dos muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 5,70 mg de 19A DBCO y 57 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 19A oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μ M)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
17.14	4.87	5976	0.482 x 4	197.76	3.31	105	139

3. Conjugación del derivado PS 19A-DBCO con eCRM

PS 19A-DBCO: 5,7 mg (con 57 mg de sacarosa) polvo blanco

% de DBCO: 3,31

Concentración de CRM: Solución de 6,5 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 1,8:1

Procedimiento de reacción:

Al derivado 19A DBCO (5,7 mg de polvo blanco con 57 mg de sacarosa) se le añadió solución de eCRM

funcionalizada con azido (0,49 ml) proporcionando una relación de masa PS19A:CRM de 1,8:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 19A PS-CRM.

PS 19A-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.7	3.185	5.42	0.62	70	0.40	61	1.55:1	25.23	1

Ejemplo 31: Preparación de conjugados del serotipo 19A de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 19A: 90% (antrona)
 Peso mol.: 614,44
 Solución de NaIO₄ en agua (5,45 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-19A (20,83 mg corregidos al 90%, 18,75 mg, 30,5 µmol) en 9,5 ml de solución acuosa (6,5 ml de agua y 3 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH=5,5). A esta solución se añadieron 305 µl de solución de NaIO₄ (1,63 mg, 7,62 µmol, 0,25 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (10 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución oxidada de PS-19A.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 19A (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.25	20.83	2.95	9858	7.2	4.2	95.32	N/A

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS tipo 19A oxidado (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (17,57 mg, 28,59 µmol, 2,90 ml de agua) se añadió una solución tampón (0,87 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH=6.01), DMSO (0,7 ml) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (14,97 mg en 306 µl de DMSO; 28,59 µmol, 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 79 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (9,39 mg en 200 µl de agua, 57,2 µmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 µl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 110 µl de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/µl, 10 equivalentes) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml de acetato de etilo) y después se transfirió a una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y después se dializó usando 6 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el tipo ed derivado 19A DBCO. A esta solución (3,56 ml, 11,9 mg) se añadió una solución de sacarosa (120 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar dos muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 5,95 mg de 19A DBCO y 60 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 19A oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
17.57	3.76	5424	0.831 x 3	254.1	4.68	71	111

3. Conjugación del derivado PS 19A-DBCO con eCRM

PS 19A-DBCO: 5,95 mg (con 60 mg de sacarosa) polvo blanco

% de DBCO: 4,68

Concentración de CRM: Solución de 6,5 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 1.8:1

5 Procedimiento de reacción:

Al derivado 19A DBCO (5,95 mg de polvo blanco con 60 mg de sacarosa) se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,51 ml) proporcionando una relación en masa de PS19A:CRM de 1,8:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. A continuación, la mezcla se introdujo en un horno (37° C) durante 2 horas. La mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235071, 100K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 19A PS-CRM.

PS 19A-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.95	3.305	6.821	0.53	61	0.314	65	1.68:1	9.48	0.752

Ejemplo 32: Preparación de conjugados del serotipo 19F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

25 1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 19F: 90,7% (Antrona)

Peso mol: 614,44

Solución de NaIO₄ en agua (5,21 mg/ml)

30 Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-19F (22,0 mg, 35,8 µmol) en 13,75 ml de solución acuosa (11 ml de agua y 2,75 ml de tampón de acetato 0,2 M; pH=5,5). A esta solución se añadieron 117 µl de solución de NaIO₄ (0,61 mg, 2,86 µmol, 0,08 eq). La mezcla se agitó a 4° C en una nevera durante 17 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando la ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de tampón de fosfato 10 mM pH 6,7 para dar la solución oxidada de PS-19F.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 19F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.08	22.0	2.89	8786.24	5.56	N/A	99.39

45 2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS del tipo 19F oxidado (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (13,7 mg, 22,3 µmol, 2,50 ml de agua) se añadió una solución tampón (1,0 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH=6.0), DMSO (0,483 ml) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (11,68 mg en 117 µl de DMSO; 22,3 µmol, 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 70,2 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (2,8 mg en 280 µl de agua, 44,6 µmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando toda la noche a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (500 µl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 84 µl de solución de borohidruro de sodio (0,01 mg/µl, 10 equivalentes) en agua. Después de agitar durante 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (5x12 ml de acetato de etilo) y luego se transfirió a una ultracentrífuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y luego se dializó usando 5 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con tampón de fosfato 5 mM pH 7,0 (12 ml cada uno) para dar el derivado de tipo 19F DBCO. A esta solución (1,11 ml, 7,0 mg) se añadió una solución de sacarosa (70 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones de 4 mg y 3 mg cada una y se liofilizó para dar dos muestras de polvo blanco. Estas muestras liofilizadas de 19F DBCO se usaron en la siguiente reacción de conjugación.

PS 19F oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
13.7	1.92	1714	0.920 x 4	1714	5.14	88	93

3. Conjugación del derivado de PS 19F-DBCO con eCRM

PS 19F-DBCO: 4,0 mg (con 40 mg de sacarosa) polvo blanco

% de DBCO: 5,14

Concentración de CRM: Solución de 5,0 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 1.6:1

Procedimiento de reacción:

Al derivado 19F DBCO (4,0 mg de polvo blanco con 40 mg de sacarosa) se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,5 ml) proporcionando una relación de masa PS19F:CRM de 1,6:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas seguido de 37° C durante 1 hora. Se añadieron 42 μl de azida sódica (0,42 mg, 1 equivalentes). Después de 30 min, la mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 2 días (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para proporcionar una solución del conjugado 19F PS-CRM.

PS 19F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
4.0	2.5	3.75	0.84	79	0.52	77	1.63:1	16.55	1.89

Ejemplo 33: Preparación de conjugados del serotipo 19F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

PS de Tipo 19F Peso mol.: 613

Solución de NaIO₄ en agua (10 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-19F (10 mg, 16,31 μmol) en 2 ml de solución acuosa (solución de acetato sódico 10 mM, PH 4,5). A esta solución se añadieron 34,9 μl de solución de NaIO₄ (0,349 mg, 1,63 μmol, 0,1 eq). La mezcla se agitó a 4°C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235057, 20K MWCO) y luego se dializó con tampón PB de 50 mM, PH 6,8 durante 24 horas (4 intercambios, 600 ml cada uno) para dar solución de PS-19F oxidada. Después de la diálisis, se añade DMSO para obtener PS-19F en DMSO al 10% con 50 mM de tampón PB, PH 6.8.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 19F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.1	10	2	6769	9.0	83	N/A

2. Derivatización de DBCO

Concentración final de PS: 3,32 mg/ml,

Concentración final del tampón: 10% DMSO en 50 mM PB (pH 6,8)

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS del tipo 19F oxidado (8,3 mg, 13,53 μmol, 2,5 ml en DMSO al 10% 50 mM PB, PH 6,8), se añadió una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (7,08 mg en 70,84 μl de DMSO; 13,53 μmol, 10 equivalentes) a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 60 min, transcurridos los cuales se añadió una solución de cianoborohidruro de sodio (0,85 mg en 85 μl de agua; 13,53 μmol, 10 equivalentes) y se continuó agitando durante

24 horas a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235057, 20K MWCO) y luego se dializó usando 4 intercambios con etanol al 20% en tampón PB 50 mM seguido de 3 intercambios con tampón PB 50 mM para dar el derivado tipo 19F DBCO.

PS 19F oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
8.3	4	3385	235.4	7.15	78	186

3. Conjugación del derivado PS 19F-DBCO con eCRM

PS 19F-DBCO: 6 mg (con 60 mg de sacarosa) polvo blanco

DBCO: 7%.

Concentración de CRM: solución de 2,617 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 2:1

Concentración final de PS: 5,2 mg/ml

Procedimiento de reacción:

Al derivado 19F DBCO (6 mg de polvo blanco con 60 mg de sacarosa, 9,7 μmol) se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (1,15 ml) proporcionando una relación de masa de PS 19F:CRM de 2:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (23° C) durante 17 horas. A continuación, la mezcla se introdujo en una incubadora (37° C) durante 3 horas. Después de la reacción, la mezcla se diluyó 2 veces con solución de cloruro sódico al 0,9% y se redujo con borohidruro de sodio (1,849 mg en 184,9 μl de agua, 48,9 μmol, 50 equivalentes) durante 3 horas. La mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235071, 100K MWCO) y luego se dializó con PBS, PH 7 durante 24 horas (3 intercambios, 1000 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 19F PS-CRM.

PS 19F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC- MALS MDa
6	3	12	0.241	48	0.166	66	1.5:1	15.12	736 (1,05 mDa-414 KDa)

Ejemplo 34: Preparación de conjugados del serotipo 20 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 20: 68% (antrona)

Peso mol.: 1157,9 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS tipo 20 (30,1 mg, 26 μmol) en 15,00 ml de solución acuosa (11,25 ml de agua y 3,75 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH 5,5) en un tubo de muestra de poliestireno de 50 ml con barra agitadora. Una vez se hubo solubilizado el PS, se añadieron 160 μl de solución de NaIO₄ (1,11 mg, 5,2 μmol, 0,20 mol. eq.). El tubo de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un baño de agua a 25°C. La mezcla se agitó a 25°C. Después de 18 h, la mezcla de la reacción se dializó usando tres dispositivos de filtro centrífugo AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml) mediante 5 intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para obtener una solución de PS-20 oxidada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 20 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo Antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.20	30.1	2.6	6254.57	59.06	10.34	63	-

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

Se añadió PS20-OX (11,7 mg, 10,1 μmol , 1,61 ml) a tampón de fosfato (0,600 ml, 200 mM, pH 6,0) al que se añadió DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 eq., 523 g mol^{-1} en DMSO, 33 mg/ml, 160 μl) y una cantidad adicional de DMSO (207 μl). La mezcla de la reacción se agitó a 25°C durante 25 minutos antes de añadir una solución de cianoborohidruro de sodio (2 eq., 52,5 mg/ml, 24 μl) y se agitó durante un día. Después de tapar con 1 eq. de solución de borohidruro de sodio, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml) y se liberó de solvente por burbujeo. El derivado de DBCO se purificó mediante unidades de diálisis centrífuga dos veces (Amicon MWCO de 30 kDa) usando 5 intercambios con etanol al 20% en agua seguido de 3 intercambios con agua cada vez (12 ml cada uno) para dar el derivado 20-DBCO. A esta solución (2,09 ml, 13,65 mg) se añadió una solución de sacarosa (136,5 mg en 1,37 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 6,0 mg de 20-DBCO y 60 mg de sacarosa para su uso en la reacción de conjugación.

PS 20 oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de Antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
11.7	2.09	1112.43	0.336 x 4	29.04	2.6	123	610

3. Conjugación del derivado de PS 20-DBCO con eCRM

PS 20-DBCO: 5,0 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo liofilizado
 % de DBCO: 2,0
 Concentración de CRM: 5,29 mg/ml de solución
 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió 20-DBCO en solución de cloruro sódico al 0,9% (2,684 ml, filtrado de 0,22 μm), tampón de fosfato (pH 7,0, 0,5M, 0,160 ml) y DMSO (0,400 ml). Se añadió gota a gota solución de Azido-CRM (5,29 mg/ml, 0,756 ml) para proporcionar una relación de entrada de PS20:CRM de 1,5:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 36 horas. La reacción de clic se inactivó añadiendo una solución de azida sódica (10 mg/ml, 50 μl). El conjugado de CRM se transfirió a un tubo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (4 intercambios, 1 L cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 μm , 33 mm de polietersulfona) para dar una solución estéril de conjugado 20-CRM.

PS 20-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
6.0	4.0	7.00	0.640	75	0.366	64	1.75:1	LLOQ	1.224

Ejemplo 35: Preparación de conjugados del serotipo 22F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS tipo 22F: 89% (Antrona)
 Peso mol: 996,88
 Solución de NaIO₄ en agua (5 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS tipo 22F (30,2 mg, 30,3 μmol) en 10,5 ml de agua y 4,5 ml de tampón de acetato 200 mM (pH 5,26) y 132 μl de solución de NaIO₄ (0,65 mg, 3,03 μmol , 0,1 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas, transcurridas las cuales, la muestra oxidada se purificó usando ultracentrifuga AMICON (MWCO de 100 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución oxidada de PS-22F.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 22F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.10	30.2	3.351	7389.41	20.02	3.3	81.73

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS tipo 22F oxidado (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (7,0 mg, 7,02 μmol, 0,956 ml de agua) se añadió una solución tampón (0,525 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH=6.0), DMSO (151 μl) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (3,67 mg en 112 μl de DMSO; 7,02 μmol, 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 17 μl de una solución de cianoborohidruro de sodio (0,88 mg en 17 μl de agua; 14,06 μmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se diluyó con tampón de fosfato (250 μl de solución 200 mM, pH=6) antes de añadir 9 μl de solución de borohidruro de sodio (31 mg/ml, 10 equivalentes) en agua. Después de 30 min, la mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (4x5 ml). El extracto se transfirió a un filtro de ultracentrífuga AMICON (MWCO de 100 kDa 6-12 ml) y luego se dializó mediante 6 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno). La SEC-HPLC muestra DBCO libre, por lo que la muestra se volvió a dializar usando 3 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado tipo 22F DBCO. A esta solución (2.35 ml, 5.2 mg) se añadió una solución de sacarosa (52 mg en 0,520 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones y cada una se liofilizó para dar dos muestras de polvo blanco. La muestra contenía 2,4 mg y 2,8 mg de 22F DBCO y 24 mg y 28 mg de sacarosa respectivamente para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 22F oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
7.0	2.53	739.74	0.144 x 3	27.57	1.24	80	844

3. Conjugación del derivado de PS 22F-DBCO con eCRM

PS 22F-DBCO: 2,4 mg (con 24 mg de sacarosa) polvo blanco
 % de DBCO: 1,24
 Concentración de CRM: Solución de 4 mg/ml
 PS:CRM (relación de entrada): 1.4:1

Procedimiento de reacción:

Se disolvió el derivado 22F DBCO (2,4 mg de polvo blanco con 24 mg de sacarosa) en una solución de cloruro sódico al 0,9% (0,075 ml). Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,142 ml de solución) proporcionando una relación de masa de PS22F:CRM de 1,4:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente antes de agitar suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 48 horas. Se añadió solución de azida sódica (16 μl, 10 mg/ml en agua). Después de 30 min, la mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 24 horas (5 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 μm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 22F PS-CRM.

PS 22F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
2.4	1.71	3.834	0.29	55	0.37	49	1.53	20.6	2.42

Ejemplo 36: Preparación de conjugados del serotipo 23F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de PS del tipo 23F: 85% (antrona)
 Peso mol: 792,62

Solución de NaIO₄ en agua (5,86 mg/ml)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS-23F (20,21 mg corregidos al 85%, 17,18 mg, 26,7 µmol) en 10 ml de solución acuosa (7,5 ml de agua y 2,5 ml de tampón de acetato 0,2 M; pH=5,5). A esta solución se añadieron 119 µl de solución de NaIO₄ (0,695 mg, 4,0 µmol, 0,15 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 4 horas. A continuación, la muestra oxidada se purificó usando un filtro de ultracentrifuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) 6 intercambios (12 ml) de agua de grado HPLC para dar la solución PS-23F oxidada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 23F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.15	20.21	2.41	7967	4.11	3.51	88	N/A

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS del tipo 23F oxidado (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (13,51 mg, 17,0 µmol, 2,14 ml de agua) se añadió solución tampón (0,85 ml de solución tampón de fosfato 200 mM, pH=6,01), DMSO (310 µl) y una solución de DBCO-PEG-4-NH₂ (8,93 mg en 170 µl de DMSO; 17,0 µmol, 10 equivalentes), todo a 25° C. A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 42 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (6.1 mg en 120 µl de agua; 34,0 µmol, 20 equivalentes) y se continuó agitando durante 2 días a 25° C. La mezcla de la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml de acetato de etilo) y después se transfirió a un filtro de ultracentrifuga AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y después se dializó usando 6 intercambios con etanol al 20% (12 ml cada uno) en agua seguido de 3 intercambios con agua (12 ml cada uno) para dar el derivado DBCO tipo 23F. A esta solución (7,58 ml, 13,8 mg) se añadió una solución de sacarosa (138 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar tres muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 6,9 mg de DBCO 23F y 69 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 23F oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
13.51	7.61	2292	0.601 x 2	116.98	5.1	102	361

3. Conjugación del derivado PS 23F-DBCO con eCRM

PS 23F-DBCO: 6,90 mg de polvo blanco con 69 mg de sacarosa

% de DBCO: 5,1

Concentración de CRM: solución de 2,617 mg/ml

PS:CRM (relación de entrada): 2:1

Procedimiento de reacción:

Al derivado 23F DBCO (6,90 mg de polvo blanco con 69 mg de sacarosa) se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (solución de 1,32 ml) proporcionando una relación de masa de PS23F:CRM de 2:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 17 horas. A continuación, la mezcla se introdujo en un horno (37° C) durante 3 horas. La mezcla de PS-CRM conjugada se transfirió a un filtro de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235071, 100K MWCO) y luego se dializó con solución de cloruro sódico al 0,9% durante 24 horas (3 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro Millex-HV (0,45 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 23F PS-CRM.

PS 23F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
6.90	3.45	5.65	0.87	71	0.422	69	2.06:1	23.62	1.4

Ejemplo 37: Preparación de conjugados del serotipo 33F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2**1. Oxidación**

- 5 Pureza de PS del tipo 33F: 75% (antrona)
Peso mol.: 973

Procedimiento de reacción:

- 10 Se disolvió polvo de PS tipo 33F (34,0 mg, 35,0 μ mol) en 17,0 ml de solución acuosa (12,0 ml de agua y 5,0 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH 5,5) en un tubo de muestra de poliestireno de 50 ml con barra agitadora. Una vez se hubo solubilizado el PS, se añadieron 59 μ l de solución de NaIO_4 (1,49 mg, 7,0 μ mol, 0,20 mol eq.). El tubo de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un baño de agua a 4°C. La mezcla se agitó a 4°C. Después de 18 h, la mezcla de la reacción se dializó usando tres dispositivos de filtro centrífugo AMICON® Ultra-15 (MWCO de 100 kDa; 15 ml) mediante 4 intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para obtener una solución oxidada de PS-33F.

20	Eq Mol de NaIO_4	PS 23F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
	0.20	34.0	2.74	4637.58	47.90	7.62	36

2. Derivatización de DBCO

- 25 Procedimiento de reacción:

- 30 A una solución de PS de tipo 33F oxidado (11,2 mg, 11,51 μ mol, 2,49 ml), solución tampón (0,114 ml de tampón de fosfato 0,5 M pH 6,0), se añadió una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (6,039 mg en 200 μ l de DMSO; 6,33 μ mol, 0,55 eq.). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 63 μ l de una solución de cianoborohidruro de sodio (4,5 mg en 100 μ l de agua; 34,54 μ mol, 2,0 eq.). La mezcla de la reacción se envolvió en papel de aluminio y se continuó agitando en un baño de agua ajustado a 25°C durante 2 días. La reacción se detuvo el segundo día mediante la adición de 44 μ l de una solución de borohidruro de sodio (3,12 mg en 312 μ l de agua, 11,51 μ mol, 1,0 eq.). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de la reacción se extrajo con diclorometano (3x10 ml) seguido de acetato de etilo (3x10 ml). El extracto se burbujeó con N₂ durante 20 minutos para eliminar el acetato de etilo residual y luego se transfirió a 2 dispositivos de filtración centrífuga AMICON® Ultra-15 (MWCO de 100 kDa; 15 ml). La diálisis se realizó realizando tres intercambios con una solución de DMSO al 3% (15 ml cada uno), seis intercambios con una solución de etanol al 20% (15 ml cada uno) y tres intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para dar el derivado DBCO 33F. A esta solución (1,23 ml, 4,0 mg) se añadió una solución de sacarosa (40 mg 0,4 ml de agua). Esta solución combinada se liofilizó para dar un polvo fino y blanco. La muestra de PS33F DB se almacenó a 4° C hasta que se necesitó para la reacción de conjugación.

45	PS 23F oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (μ M)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (μ M)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
	11.2	2.44	1112.4	0.390	32.85	3.0	71	1290

3. Conjugación del derivado de PS 33F-DBCO con eCRM

- PS 33F-DBCO: 4 mg (con 40 mg de sacarosa) polvo blanco
% de DBCO: 3,0
Concentración de CRM: 6,009 mg/ml de solución
55 PS:CRM (relación de entrada): 1.5:1

Procedimiento de reacción:

- 60 Se disolvió el derivado 33F DBCO (4,0 mg de polvo blanco con 40 mg de sacarosa) en solución de cloruro sódico al 0,9% (5,32 ml), tampón de fosfato pH 7 (0,267 ml, 0,5 M) y DMSO (0,667 ml). Se añadió la solución de eCRM funcionalizada con azido (0,445 ml de solución) proporcionando una relación de masa de PS33F:CRM de 1,5:1 (p/p). La mezcla de la reacción se mezcló suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20°C) durante 19 horas. La reacción de clic se inactivó mediante la adición de una solución de azida sódica (10 mg/ml, 50 μ l). A continuación, la mezcla de la reacción se diluyó con solución de cloruro sódico al 0,9% (7,0 ml) y se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO). La muestra se

sometió a diálisis en solución de cloruro sódico al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado PS-CRM 33F.

PS 33F-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
4.0	2.67	7.82	0.545	106	0.212	62	2.57	LLOQ	1.87

Ejemplo 38: Preparación de conjugados del serotipo 7F de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza del PS de tipo 7F: 86% (antrona, CRB-21-20)
Peso mol.: 1227 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

Se disolvió el polisacárido nativo (19,5 mg, corregido al 86%, 16,8 mg, 13,7 µmol) en 3,9 ml de agua. A esta solución se añadieron 4,58 ml de agua y 0,293 ml de tampón de acetato sódico (1,5 M, pH 5,4). A continuación, se añadieron 30 µl de solución de peryodato sódico (300 µg, 1,4 µmol, 0,1 eq) a la solución agitada. La reacción se agitó a 22° C durante 3 horas. A continuación, el PS oxidado se concentró dos veces usando un concentrador centrífugo (Amicon MWCO de 30 kDa). A continuación, el PS concentrado se intercambió con tampón en agua usando columnas de filtración de gel (GE Healthcare PD-10, método de centrifugación).

Eq Mol de NaIO ₄	PS 7F (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)	Nota
0.1	16.8	4.0	3260	6.2	n/d	95	N/A

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A 7F-OX (1,9 ml de 4,0 mg/ml; 7,6 mg, 6,2 µmol) se añadieron 0,15 ml de fosfato sódico (1 M, pH 6,3). Después a la solución en agitación se añadieron 0,23 ml de DBCO-PEG₄-NH₂ (27,1 mM en DMSO, lote 1730; 6,2 µmol, 1,0 eq). Después de 5 min de agitación, a la solución de agitación se añadieron 0,039 ml de NaCNBH₃ (20 mg/ml en agua; 12,4 µmol, 2,0 eq). La reacción se agitó a 22° C durante 40 horas. A continuación, se añadieron a la solución 0,024 ml de borohidruro de sodio (10 mg/ml en agua; 6,3 µmol, 1,0 eq). Después de 15 min de agitación, el PS se purificó por intercambio tampón en agua mediante columnas de filtración de gel (columnas Thermo Zeba, 40 kDa MWCO).

PS 7F oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
7.6	2.3	2282	0.14 x 2	111	4.8	85	175

3. Conjugación del derivado de PS 7F-DBCO con eCRM

PS 7F-DBCO: 2,8 mg (2,8 mg/ml en agua)
% de DBCO: 4,8
Concentración de CRM: Solución de 4,7 mg/ml
PS:CRM (relación de entrada): 1,6:1

Procedimiento de reacción:

A 7F-DBCO (1 ml de 2,8 mg/ml en agua) en un tubo de centrífuga de 5 ml se añadieron 0,128 ml de fosfato potásico (0,5 M, pH 7,5). A esta solución se añadieron 0,372 ml de eCRM funcionalizado con azida (4,7 mg/ml en 20 mM de fosfato potásico, pH 7,1, 7,5% de sacarosa), dando por tanto una relación de masa de entrada de 1,6:1 (p/p). La solución se colocó en un balancín orbital y se agitó (de tal manera que la solución se moviera de un extremo a otro

del tubo) durante 16 horas a 22° C. A continuación, el conjugado se dializó en cloruro sódico al 0,9% usando una membrana de diálisis de 300 kDa (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 1 ml) durante 48 horas con cambios de dializado (500 ml) después de 1 hora y 4 horas. La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla (Pall Acrodisc Supor, 0,22 µm, 13 mm de diámetro) para dar solución de conjugado 7F-CRM.

Ejemplo 39: Preparación de conjugados del serotipo 1 de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

Pureza de la PS de tipo 1: 80% (ensayo del ácido urónico)
Peso mol.: 625 g mol⁻¹

Procedimiento de reacción:

Se disolvió el polisacárido nativo (20,2 mg, 32,32 µmol) en 9,5 ml de solución acuosa (7,0 ml de agua y 2,5 ml de tampón de acetato, 200 mM, pH 5,24). A esta solución se añadieron 492 µl de solución de peryodato sódico (3,45 mg, 16,16 µmol, 0,5 eq). La mezcla se agitó a 25° C durante 18 horas. El PS oxidado se purificó usando diálisis centrífuga Amicon de MWCO de 30 kDa usando 6 intercambios con agua para dar la solución PS-1 purificada.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 1 (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de ácido urónico (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.50	20.2	2.61	10777.6	2.3	2.16	87

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS de tipo 1 oxidada (suponiendo un nivel de oxidación del 10%) (16 mg, 25,6 µmol, 2,4 ml de agua) se añadió solución tampón (0,424 ml de tampón de fosfato 500 mM, pH=6,74), DMSO (572 µl) y una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (13,4 mg en 134 µl de DMSO; 25,6 µmol, 10 eq). A continuación, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 32 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (3,2 mg en 32 µl de agua; 51,2 µmol, 20 eq) y se continuó agitando durante 3 días a 25° C. Se añadió una solución tampón (0,300 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH=6,0) seguido de borohidruro de sodio (0,97 mg en 100 µl, 25,6 µmol, 10 eq) y se agitó durante 30 min a 25° C. La mezcla de la reacción se extrajo con diclorometano (4x5 ml). El extracto acuoso se transfirió a dos filtros ultracentrífugos AMICON (MWCO de 30 kDa 6-12 ml) y después se dializó usando 5 intercambios con etanol al 20% en agua (12 ml cada uno) seguido de 3 intercambios con DMSO al 3% en agua (12 ml cada uno), 3 intercambios con cloruro sódico al 0,9% y 3 intercambios con agua para dar el derivado DBCO de tipo 1. A esta solución (1,37 ml, 10,0 mg) se añadió una solución de sacarosa (100 mg en 1 ml de agua). La solución combinada se dividió en dos porciones iguales y cada una se liofilizó para dar dos muestras de polvo blanco. Cada muestra contenía 5,0 mg de 1-DBCO y 50 mg de sacarosa para su uso en la siguiente reacción de conjugación.

PS 1 oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ensayo de ácido urónico (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
16	2.0	2909.0	0.784 x 4	290.19	2.5	91	315

3. Conjugación del derivado de PS 1-DBCO con eCRM

PS 1-DBCO: 5,0 mg (con 50 mg de sacarosa) polvo liofilizado
% de DBCO: 2,5
Concentración de CRM: 4,86 mg/ml de solución
PS:CRM (relación de entrada): 1.7:1

Procedimiento de reacción:

El polvo liofilizado de tipo 1-DBCO (5 mg) se disolvió en una solución de cloruro sódico filtrado al 0,9% (5,39 ml) y tampón de fosfato (250 µl, 0,5 M, pH 7,0). Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (0,47 ml) para proporcionar una relación de masa de entrada PS-1:CRM de 1,7:1 (p/p). La solución se mezcló muy suavemente a mano antes de mezclarla suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (20° C) durante 18 horas. La reacción de clic se inactivó añadiendo una solución de azida sódica (10 mg/ml, 52 µl). El conjugado de CRM se transfirió a tubos de diálisis prelavados (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, 300K MWCO, 10 ml) y luego se dializó con

solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 48 horas (8 intercambios, 800 ml cada uno). La solución dializada se filtró a través de un filtro de jeringuilla Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener una solución de conjugado 1-CRM.

PS 1-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Ácido urónico (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.0	2.94	6.47	0.56	72	0.283	62	1.98:1	8.25	1.02

Ejemplo 40: Preparación de conjugados del serotipo 10A de PS neumocócico con un eCRM de la Tabla 2

1. Oxidación

PS de Serotipo 10A lote N°: 63662302 (ATCC)
Pureza de PS 10A: 77% (antrona)
Peso Mol: 1013 kDa (Unidad de Repetición=1227 g/mol)

Procedimiento de reacción:

Se disolvió polvo de PS del tipo 10A (25,99 mg, 21,18 µmol) en 12,995 ml de solución acuosa (9,746 ml de agua y 3,249 ml de tampón de acetato 0,2 M, pH 5,5) en un tubo de muestra de poliestireno de 50 ml con barra agitadora. Una vez se hubo solubilizado el PS, se añadieron 135 µl de solución de NaIO₄ (0,27 mg, 1,26 µmol, 0,06 mol eq.). El tubo de reacción se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un refrigerador para agitar a 4°C. Después de 45 minutos, la mezcla de la reacción se dializó usando tres dispositivos de filtro centrífugo AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml) mediante 6 intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para obtener una solución oxidada de PS-10A.

Eq Mol de NaIO ₄	PS 10A (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	% de Oxidación (BCA)	% Oxidación (ensayo de aldehído)	Rendimiento de PS (%)
0.06	25.99	2.381	6757.20	16.58	3.13	76

2. Derivatización de DBCO

Procedimiento de reacción:

A una solución de PS tipo 10A oxidado (18,15 mg, 14,79 µmol, 3,371 ml), se añadió solución tampón (0,259 ml de tampón de fosfato 0,5 M pH 6,0), DMSO (0,145 ml) y una solución de DBCO-PEG₄-NH₂ (7,7 mg en 154 µl de DMSO; 14,79 µmol, 1 mol eq.). La mezcla de la reacción se agitó a 4°C durante 30 min, transcurridos los cuales se añadieron 101 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio (1,9 mg en 101 µl de agua, 2 mol eq.). La mezcla de la reacción se envolvió en papel de aluminio y se continuó agitando en un frigorífico a 4°C durante 2 días. La reacción se detuvo el segundo día mediante la adición de 85 µl de una solución de borohidruro de sodio (0,56 mg; 14,79 µmol, 1 mol eq.). Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de la reacción se extrajo con diclorometano (3x15 ml). El extracto se burbujeó con N₂ durante 15 minutos para eliminar el diclorometano residual y luego se transfirió a un dispositivo de filtración centrífuga AMICON® Ultra-15 (MWCO de 30 kDa; 15 ml). La diálisis se realizó realizando tres intercambios con una solución de DMSO al 3% (15 ml cada uno), tres intercambios con una solución de etanol al 20% (15 ml), dos intercambios con una solución de cloruro sódico al 0,9% y dos intercambios con agua de grado HPLC (15 ml cada uno) para dar el derivado 10A DBCO. A esta solución (3,371 ml, 15,06 mg) se añadió una solución de sacarosa (150,6 mg en 1,506 ml de agua). Esta solución combinada se dividió en tres fracciones iguales, y cada una se liofilizó para dar un polvo fino y blanco. Después de la liofilización, todas las fracciones se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron para la reacción de conjugación.

PS 10A oxidado (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (µM)	Derivatización de DBCO 309 nm Abs	Derivatización de DBCO (µM)	Incorporación de DBCO (%)	Rendimiento de PS-DBCO (%)	SEC-MALS kDa
18.15	3.371	1290.30	0.333	27.21	2.1	88	540

3. Conjugación del derivado PS 10A-DBCO con eCRM

PS 10A-DBCO: 5,20 mg (con 52,0 mg de sacarosa) polvo liofilizado
 % de DBCO: 2,1
 CRM: 4,962 mg/ml en 20 mM Histidina pH 7,1 (7,5% Sacarosa)
 PS:CRM (relación de masa de entrada): 1.25:1

Procedimiento de reacción:

El derivado 10A DBCO (5,2 mg de polvo blanco con 52,0 mg de sacarosa) se disolvió en solución de cloruro sódico al 0,9% (1,502 ml), tampón de fosfato pH 7 (0,104 ml, 0,5 M) y DMSO (0,156 ml). Se añadió solución de eCRM funcionalizada con azido (solución de 0,838 ml) proporcionando una relación de masa PS10A:CRM de 1,25:1 (p/p). La mezcla de la reacción, a una concentración de 2,0 mg/ml de PS, se mezcló suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente (22°C) durante 2 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se diluyó a 1,0 mg/ml y se dejó agitando a 22° C durante 20 horas adicionales. La reacción de conjugación se terminó con la adición de azida sódica (7,5 mg, 115 µmol). A continuación, la mezcla de la reacción se diluyó con solución de cloruro sódico al 0,9% hasta un volumen final de 7 ml y se transfirió a un dispositivo de diálisis prelavado (Spectrumlab Float-A-Lyzer G2, N° de cat. G235060, 300K MWCO). La muestra se sometió a diálisis en solución de cloruro sódico al 0,9% durante 48 horas (2 intercambios, 1 L cada uno; 1 intercambio, 4 L). La solución dializada se filtró a través de un Millex-GP (0,22 µm, 33 mm de polietersulfona) para obtener la solución conjugada 10A PS-CRM.

PS 10A-DBCO (mg)	CRM (mg)	Vol. después de purificación (ml)	Antrona (mg/ml)	Recuperación de PS (%)	BCA (CRM) (mg/ml)	Recuperación de CRM (%)	relación CJD PS:CRM	PS libre (%)	SEC-MALS MDa
5.20	4.16	8.21	0.553	87	0.229	45	2.4:1	17.71	1.047

Ejemplo 41: Evaluación de la incorporación de DBCO-PEG₄-amina y DBCO-amina en polisacáridos neumocócicos

Se oxidaron una variedad de polisacáridos neumocócicos como se ha descrito anteriormente y se hicieron reaccionar con DBCO-PEG₄-amina (DBCO o DB) o DBCO-amina (DBCA o DA) en las mismas condiciones para determinar el efecto del conector sobre la eficacia de incorporación. La tabla siguiente muestra que en todos los serotipos probados, excepto uno, la DBCO-amina se incorpora con una eficacia más alta que la DBCO-PEG₄-amina por cada 100 unidades de repetición de polisacárido.

Muestra de PS oxidado	Muestra de PS DB/DA	Condiciones de reacción de DB/DA	% de incorporación de DBCO/DBCA	% de rendimiento de DB/DA-PS	Tamaño de DB/DA-PS, kDa
5-OX	5-DB (15,5 mg)	5 mg/ml, 1 eq de DBCO, 10% de DMSO, Tampón de fosfato 50 mM, pH 6,7, 25 C, 3 d	4.9	89	
	5-DA (15,5 mg)	5 mg/ml, 1 eq de DBCA, 10% de DMSO, Tampón de fosfato 50 mM, pH 6,7, 25 C, 3 d	8.3	83	
9V-OX	9V-DB (17,1 mg)	5,0 mg/ml, 2 d, 50 mM Tampón de fosfato, pH 6,0, 1 eq mol. DBCO, 15% de DMSO, 25° C	3.9	56	
	9V-DA (17,1 mg)	5,0 mg/ml, 2 d, 50 mM Tampón de fosfato, pH 6,0, 1 eq mol. DBCA, 15% de DMSO, 25° C	6	80	

(continuación)

Muestra de PS oxidado	Muestra de PS DB/DA	Condiciones de reacción de DB/DA	% de incorporación de DBCO/DBCA	% de rendimiento de DB/DA-PS	Tamaño de DB/DA-PS, kDa
14-OX	14-DB (15,65 mg)	5,0 mg/ml, 50 mM Tampón de fosfato pH 6,7, 1,0 mol. eq. DBCO, 15% de DMSO, 25° C 48 h	8	80	
	14-DA (15,65 mg)	5,0 mg/ml, 50 mM Tampón de fosfato pH 6,7, 1,0 mol. eq. DBCA, 15% de DMSO, 25° C 48 h	4.6	67	
23F-OX	23F-DB (22,3 mg)	4 mg/ml, 48 h, 100 mM pH 6,0, 0,8 eq DBCO, 15%. de DMSO, 25° C	5.5	68	
	23F-DA (22,3 mg)	4 mg/ml, 48 h, 100 mM pH 6,0, 0,8 eq DBCA, 15%. de DMSO, 25° C	7.5	63	
22F-OX	22F-DB (7,0 mg)	2 mg/ml, 1 eq de DBCO, 15% de DMSO, pH 6, 25° C 48 h.	0.8	101	
	22F-DA (7,0 mg)	2 mg/ml, 1 eq de DBCA, 15% de DMSO, pH 6, 25° C 48 h. Purificación Ppt.	4.3	104	
22F-OX	22F-DB (7,0 mg)	4 mg/ml, 1 eq de DBCO, 15% de DMSO, pH 6, 25° C 48 h.	1.2	80	838
	22F-DA (14,0 mg)	4 mg/ml, 1 eq de DBCA, 15% de DMSO, pH 6, 25° C 48 h. Purificación Ppt.	4.3	73	790
10A-OX	10A-DB (14,60 mg)	7 mg/ml, 10% DMSO, 50 mM Tampón de fosfato, pH 6.0, 1 eq mol. DBCO, 4° C, 2 d	1.5	88	
	10A-DA (14,60 mg)	7 mg/ml, 10% DMSO, 50 mM Tampón de fosfato, pH 6.0, 1 eq mol. DBCA, 4° C, 2 d	3.8	82	
7F-OX	7F-DB (12 mg)	2,9 mg/ml 1 eq DBCO (lote N° 1730), 99 mM fosfato pH 6,3, 21 h @ RT, 10% DMSO	1.9	78	160
	7F-DA (12 mg)	2,9 mg/ml 1 eq DBCA (lote N° 1818), 99 mM fosfato pH 6,3, 21 h @ RT, 10% DMSO	4.5	76	177

Ejemplo 42: Comparación de la conjugación de DBCO-PEG₄-amina y DBCO-amina con eCRM

Los polisacáridos neumocócicos enlazados a DBCO-PEG₄-amina (DB) o DBCO-amina (DA) se conjugaron con el mismo eCRM de la Tabla 2 en condiciones de reacción idénticas siguiendo las líneas de los ejemplos anteriores para evaluar el efecto del conector sobre la eficacia de la conjugación. La tabla siguiente muestra que los conjugados formados con polisacárido enlazado a DBCO-amina generalmente dan como resultado menos polisacárido libre y un mayor tamaño del conjugado.

DBCO PS	Escala de PS (mg)	Conc. de PS mg/ml	Conc. de Prot., mg/ml	Relación de entrada	Condiciones de reacción de conjugación	% de Rendimiento (PS)	Relación PS:Prot	% de PS libre	Tamaño de Conjugado MDa
22F- DB	2.4	3.2	2.3	1.4	3,2 mg/ml, 10% de DMSO, 48h, rt, 300 KDa diálisis, filtro Millex- GP	53	1.5	20.5	3.6
22F- DA	2	3.2	2.3	1.4	3,2 mg/ml, 10% DMSO, 48h, rt, 300KDa diálisis, filtro Millex- GP	37	1.7	LLOQ<9.2%	6.2
7F-DB	4	2.6	1.6	1.6	2,6 mg/ml, 18h, RT, diálisis 300 kDa, filtro Millex-MP	94	2	31	1.3
7F-DA	4	2.6	1.6	1.6	2,6 mg/ml, 18h, RT, diálisis 300 kDa, filtro Millex-MP	84	2	14	1.8

Ejemplo 43: Inmunogenicidad de los conjugados serotipo de PS neumocócico-eCRM

Se realizaron experimentos para determinar las respuestas de anticuerpos de IgG y OPA funcionales totales en ratones o conejos después de la administración de una variedad de conjugados de polisacárido neumocócico-eCRM monovalentes producidos de acuerdo con la presente divulgación. Se usaron ensayos de actividad opsonofagocítica (OPA) para medir anticuerpos funcionales en suero murino específicos para varios serotipos de *S. pneumoniae*. Las mediciones de OPA se basaron en Moon H. Nahm y Robert L. Burton, "Protocol for opsonophagocytic killing assay for antibodies against Group B Streptococcus (UAB GBS OPA)", Versión B.04, marzo de 2016 (Versión original A.01 publicada en septiembre de 2011) (www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/UAB-GBS-OPA.pdf) y "Protocol for multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA) for antibodies against *Streptococcus pneumoniae*" Versión E.02, diciembre de 2014 (www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/UAB-MOPA.pdf). La FIG. 3 muestra la actividad opsonofagocítica (OPA) después de la administración de conjugados monovalentes de polisacárido neumocócico-eCRM en ratones. También se midió el anticuerpo de unión a polisacárido (IgG) total específico para cada polisacárido neumocócico de acuerdo con los métodos descritos en Yu et al., "Development of an Automated and Multiplexed Serotyping Assay for *Streptococcus pneumoniae*", *Clin Vaccine Immunol.* 2011,18(11): 1900-7. La FIG. 4 muestra las respuestas de IgG después de la administración de conjugados monovalentes de polisacárido neumocócico-eCRM en ratones.

Como se resume en las tablas siguientes, cada conjugado probado provocó respuestas de anticuerpos IgG y funcionales en ratones o conejos que fueron comparables o superiores a los resultados de OPA e IgG mostrados en la FIG. 3 y la FIG. 4.

Tipos de PS	Inmunogenicidad en ratones		Tipos de PS	Inmunogenicidad en ratones	
	IgG	OPA		IgG	OPA
1	✓	✓	22F	✓	✓
3	✓	✓	33F	✓	✓
4	✓	✓	15B	✓	✓
5	✓	✓	2	✓	✓
6A	✓	✓	9N	✓	✓
6B	✓	✓	11A	✓	✓
7F	✓	✓	12F	✓	✓

(continuación)

Tipos de PS	Inmunogenicidad en ratones		Tipos de PS	Inmunogenicidad en ratones	
	IgG	OPA		IgG	OPA
9V	✓	✓	20	✓	✓
14	✓	✓	10A	✓	✓
18C	✓	✓	8	✓	✓
19A	✓	✓	17F	✓	✓
19F	✓	✓			
23F	✓	✓			

Se preparó una combinación de conjugados para cada uno de los 24 serotipos neumocócicos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F usando el derivado de CRM197 SEQ ID NO:9 como portador en cada conjugado. La inmunogenicidad de esta composición se probó usando un programa de 3 dosis en grupos de 7 conejos. También se comparó con la vacuna conjugada Prevnar™ 13-valente y con la vacuna no conjugada Pneumovax™ 23-valente, a la que se había añadido polisacárido no conjugado del serotipo 6A para facilitar la comparación. Las tres composiciones tenían dosis equivalentes de polisacárido por serotipo (excepto para el 6B, en el que Prevnar™ incluye una dosificación doble), lo que implicaba diluir Prevnar™ y Pneumovax™. Las tres composiciones incluían 60 µg de adyuvante de fosfato de aluminio por dosis, lo que implicaba añadir el adyuvante a Pneumovax™.

Las técnicas de conjugación divulgadas en la presente llevaron a una composición con una cantidad menor de portador CRM197 que en la vacuna Prevnar-13™ aprobada, al tiempo que incluían polisacáridos capsulares de 11 serotipos adicionales. La relación en peso global de polisacárido capsular y CRM197 en la composición conjugada 24-valente fue aproximadamente el doble de la observada en Prevnar™ 13-valente.

En la FIG. 5 (respuestas de IgG) y en la FIG. 6 (respuestas de OPA) se muestran las respuestas después de la tercera dosis. Como se esperaba, las respuestas usando las dos vacunas conjugadas fueron mucho mayores que con la vacuna no conjugada. Además, las respuestas de IgG y de OPA usando la vacuna 24-valente fueron comparables a las obtenidas usando Prevnar-13™ en los serotipos cubiertos por la vacuna aprobada, pero además fueron superiores frente a los 11 serotipos que no están incluidos en Prevnar-13. Sorprendentemente, no hubo pruebas de supresión epitópica inducida por el portador.

Ejemplo de Referencia 44: Preparación de una vacuna conjugada contra la periodontitis

Se prepara una vacuna contra *Porphyromonas gingivalis* conjugando polisacáridos capsulares (CPS) de los serotipos K1, K2, K3, K4, K5 y/o K6 de *P. gingivalis* con una proteína portadora eCRM de la siguiente manera.

Se cultiva *P. gingivalis* y se manipula mediante cualquier método adecuado. Véase, por ejemplo, Huang et al., *Mol Oral Microbiol.* 30:438-50 (2015). Los CPS se purifican mediante cualquier método adecuado. Véase, por ejemplo, Gonzalez et al. *Infect Immun.* 71:2283-2287 (2003); Schifferle et al., *J. Immunol.* 143:3035-3042 (1989); Pantosti et al., *Infect. Immun.* 59:2075-2082 (1991). Brevemente, se recoge *P. gingivalis* por centrifugación, se enjuaga con solución salina, se suspende en agua y se somete a extracción con agua-fenol caliente. Se recoge la fase acuosa, se extrae con éter y se dializa con agua filtrada estéril. El material acuoso se ajusta a pH 5,5 y se digiere durante la noche con un cóctel de nucleasas compuesto por DNasa I y RNasa A (Sigma). Se ajusta el pH hasta la neutralidad y a la muestra se añade proteinasa K (1 mg/ml; Sigma) y se incuba durante la noche a 37°C con agitación suave. A continuación, se realiza una segunda digestión con proteinasa K y se concentra el carbohidrato resultante usando una membrana de punto de corte de 10.000 de peso molecular. El CPS se precipita con etanol frío, se suspende en tampón de desoxicolato y se aísla usando una columna de filtración en gel S-400 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se agrupan las fracciones que contienen CPS de alta masa molecular (mediante SEC-MALS) y se descartan las fracciones que contienen LPS. Las fracciones agrupadas se concentran, precipitan, dializan y liofilizan.

A una solución tamponada de polisacárido se añaden X equivalentes molares (a la unidad de repetición de polisacárido; X se determina por cribado) de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP; a partir de una solución de 100 mg/ml en acetonitrilo) con agitación vigorosa. Cinco minutos después de la adición del CDAP, se añaden 0,5 equivalentes molares del conector dibenzociclooctileno-amina (a partir de una solución madre de DMSO). Después de una hora adicional, se añade glicina para inactivar cualquier éster de cianato que no haya reaccionado. Alternativamente, el CPS puede modificarse usando peryodato o química TEMPO/NCS. A continuación, el polisacárido derivatizado se purifica mediante diálisis o UF/DF. La concentración de polisacárido se mide usando un ensayo colorimétrico de antrona, y la concentración de dibenzociclooctileno se mide usando absorbancia a 309 nm. Estos dos

valores pueden combinarse para dar una estimación del porcentaje de polisacárido derivatizado con un grupo funcional de dibenciclooctano.

El conjugado se prepara mezclando el polisacárido derivatizado con una proteína de eCRM de elección, como las de la Tabla 2. Después de 18 horas de incubación, se añade un equivalente molar de azida sódica para inactivar los grupos funcionales dibenzociclooctino que no hayan reaccionado. A continuación, el conjugado se purifica mediante diálisis o UF/DF para eliminar la proteína de eCRM que no haya reaccionado. A continuación, se analiza el conjugado para determinar la concentración de polisacáridos (colorimétrica), la concentración de proteínas (colorimétrica) y se calcula el porcentaje de sacáridos libres/no conjugados. El peso molecular se mide usando SEC-MALS.

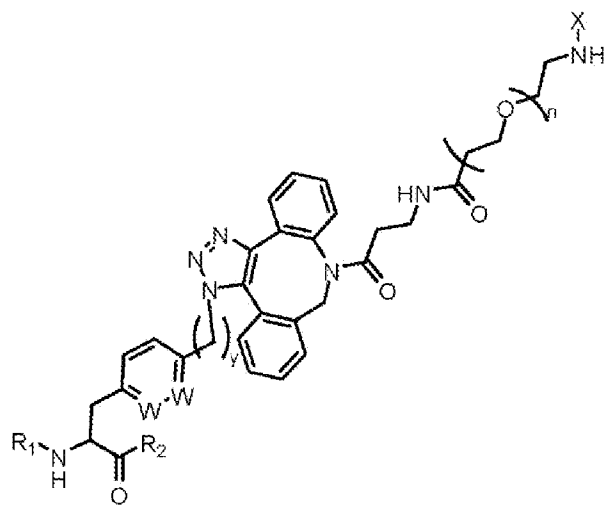
Los conjugados polisacárido:proteína se precipitan mediante la adición de una solución de desoxicolato al 1% (pH 6,8) y la incubación en hielo durante 30 minutos. Después de la incubación, se añade HCl 1M y la mezcla se centrifuga durante 20 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante restante contiene polisacárido no conjugado. Para determinar la concentración de polisacárido, se añade antrona disuelta en ácido sulfúrico a las muestras y se calienta a 95° C. durante 10 minutos. La mezcla se enfría y se mide la absorbancia a 620 nm. La concentración se calcula usando una curva estándar de los componentes monosacáridos del polisacárido.

REIVINDICACIONES

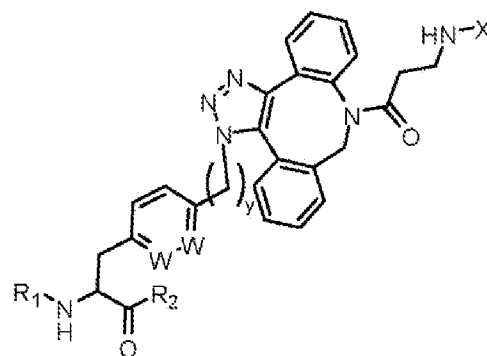
- 5 1. Una composición que comprende múltiples conjugados de proteína portadora-antígeno, en donde los múltiples conjugados proteína portadora-antígeno comprenden por lo menos 20 o 21 conjugados proteína portadora-antígeno distintos, en donde el antígeno es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, en donde:
- 10 (a) el polisacárido capsular en cada conjugado proteína portadora-antígeno distinto proviene de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae*;
- (b) la proteína portadora de los conjugados de proteína-portadora-antígeno es un polipéptido que tiene por lo menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1 y que comprende por lo menos un epítipo activador de células T y por lo menos dos aminoácidos no naturales (nnAA) que son ácido 2-amino-3-(4-(azidometil)fenil)propanoico (pAMF), en donde los polisacáridos capsulares se conjugan con los residuos de pAMF;
- 15 (c) hay un conjugado proteína portadora-antígeno distinto para cada uno de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *Streptococcus pneumoniae*; y
- (d) la relación global de peso por peso entre todos los polisacáridos de serotipo y la proteína portadora en la composición es de por lo menos 0,8.
- 20 2. La composición de la reivindicación 1, en donde los por lo menos 20 o 21 conjugados de proteína portadora-antígeno distintos comprenden por lo menos 24 conjugados proteína portadora-antígeno distintos en donde hay un conjugado de proteína portadora-antígeno distinto que comprende un polisacárido capsular para cada uno de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.
- 25 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* se conjugan con los residuos de pAMF mediante una fracción de enlace, en donde los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden un grupo ciclooctina y se conjugan con los residuos de pAMF mediante un grupo azido.
- 30 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína portadora tiene por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína portadora comprende por lo menos dos residuos de pAMF sustituidos por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K25, K34, K388, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, o K527 de la SEQ ID NO: 1.
- 35 6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína portadora de los conjugados proteína portadora-antígeno comprende por lo menos 4 o 4-6 nnAA que son pAMF.
- 40 7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la proteína portadora comprende residuos de pAMF sustituidos por lisina dentro de la SEQ ID NO: 1 de la siguiente manera: 1) un residuo del grupo que consiste en K25, K34, K38 y K40; 2) un residuo seleccionado del grupo que consisten en K213 y K215; y 3) de 2 a 4 residuos seleccionados del grupo que consiste en K228, K245, K265, K386, K523 y K527.
- 45 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde cada conjugado proteína portadora-antígeno distinto incluye la misma proteína portadora.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la relación total de peso por peso de todos los polisacáridos del serotipo con la proteína portadora en la composición es de por lo menos 0,9, por lo menos 1,0, por lo menos 1,1, por lo menos 1,2, por lo menos 1,3, por lo menos 1,4, o por lo menos 1,5.
- 50 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la relación total de peso por peso de todos los polisacáridos del serotipo con la proteína portadora en la composición es de por lo menos 1,0.
- 55 11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el antígeno está enlazado a la proteína portadora de acuerdo con la fórmula XI o XIa:

60

65



(fórmula XI)



(fórmula XIa)

en donde:

- R_1 es H, formilo o por lo menos un aminoácido de la proteína portadora mejorada;
- R_2 es OH o por lo menos un aminoácido de la proteína portadora mejorada;
- W es C;
- y es 1;
- n es por lo menos 1; y
- X es un monosacárido dentro del polisacárido capsular, dicho monosacárido es un poliol.

FIGURA 1

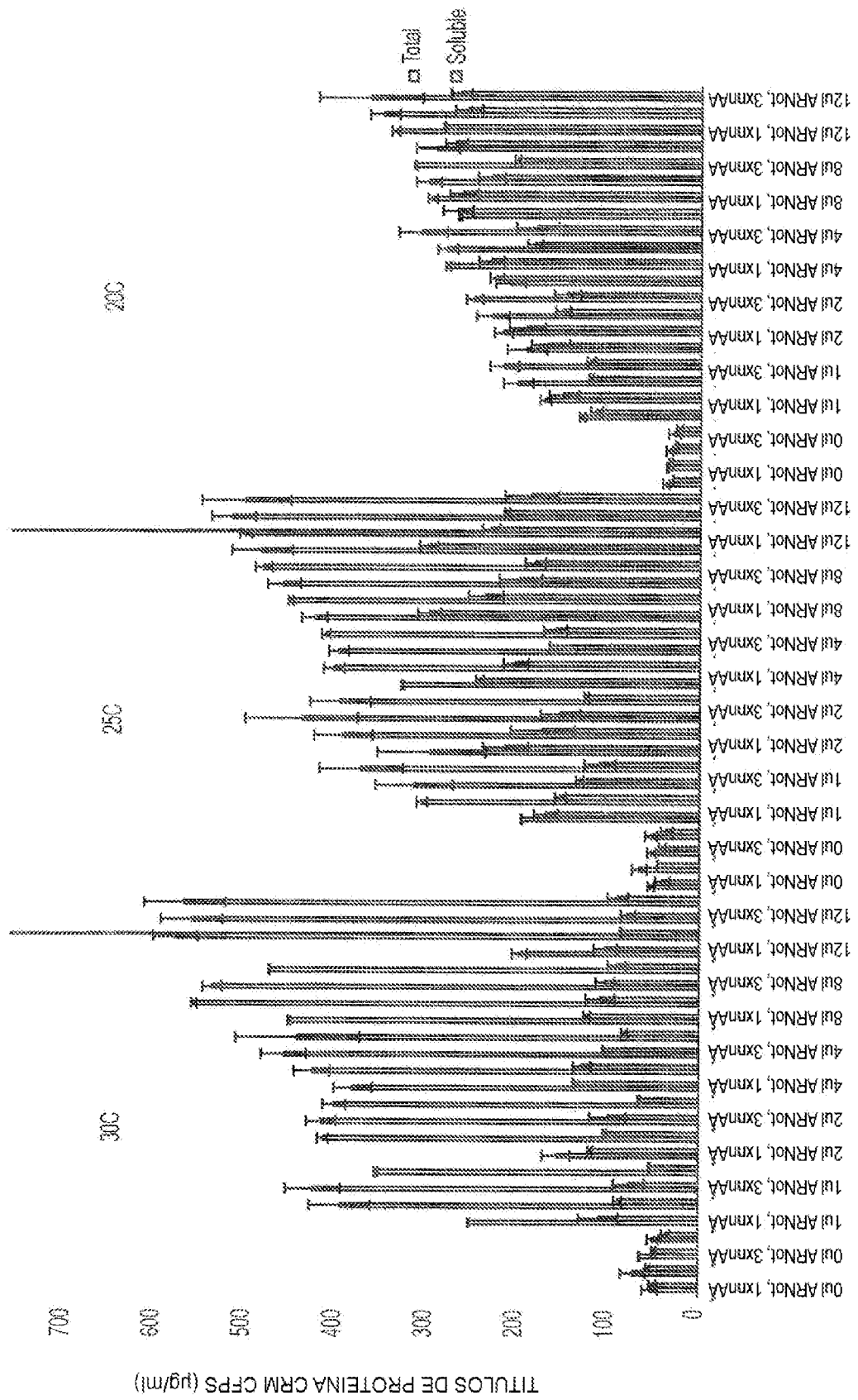


FIGURA 2

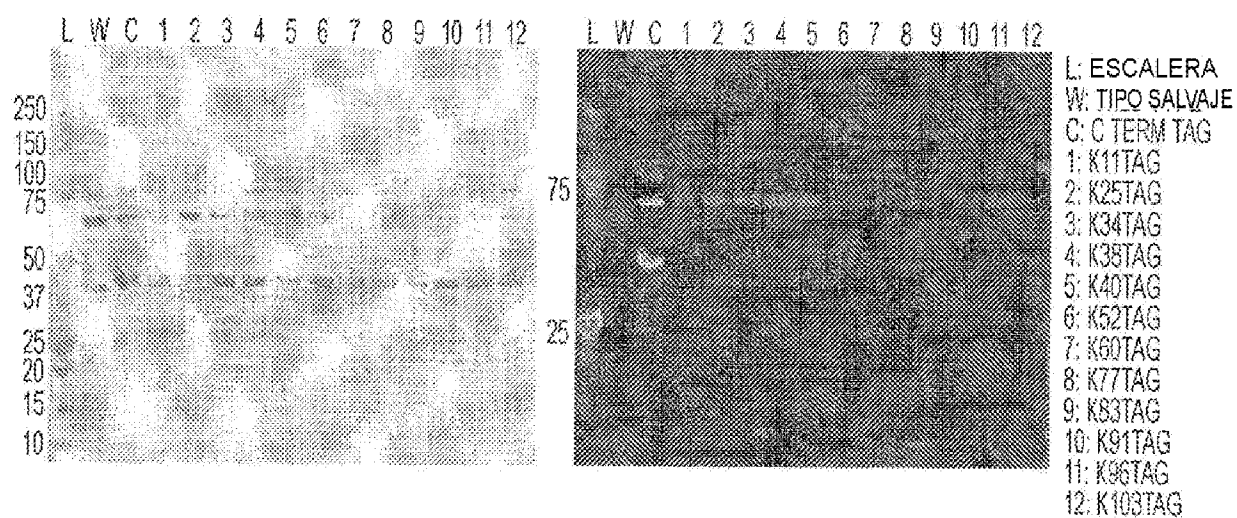


FIGURA 3

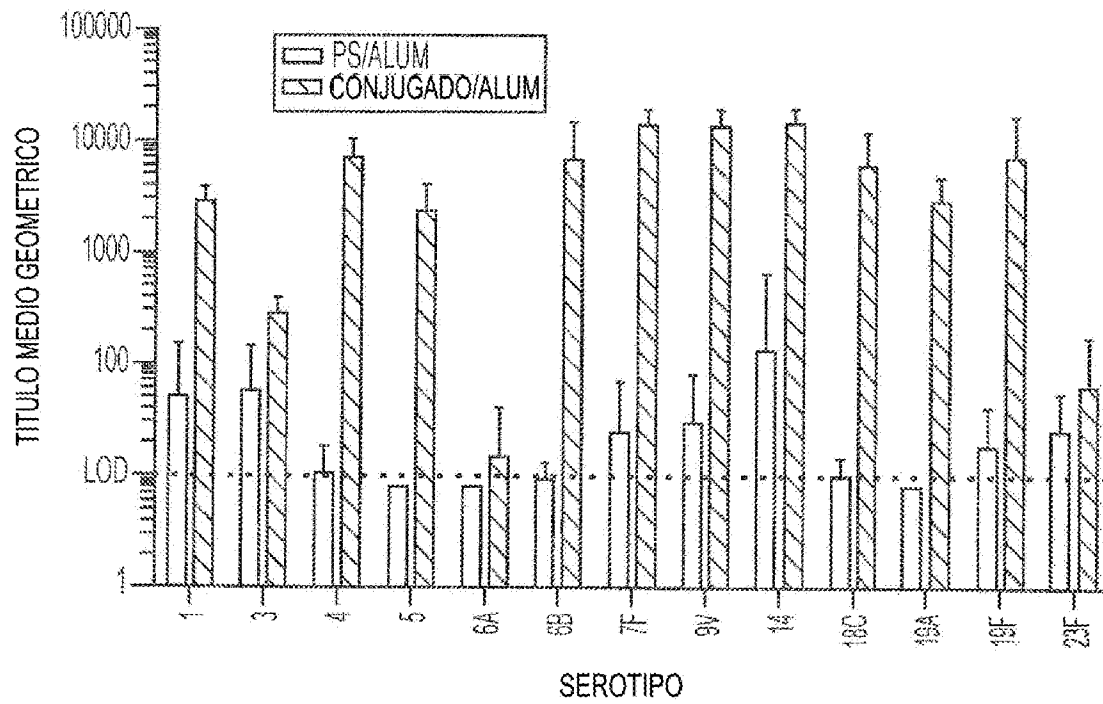


FIGURA 4

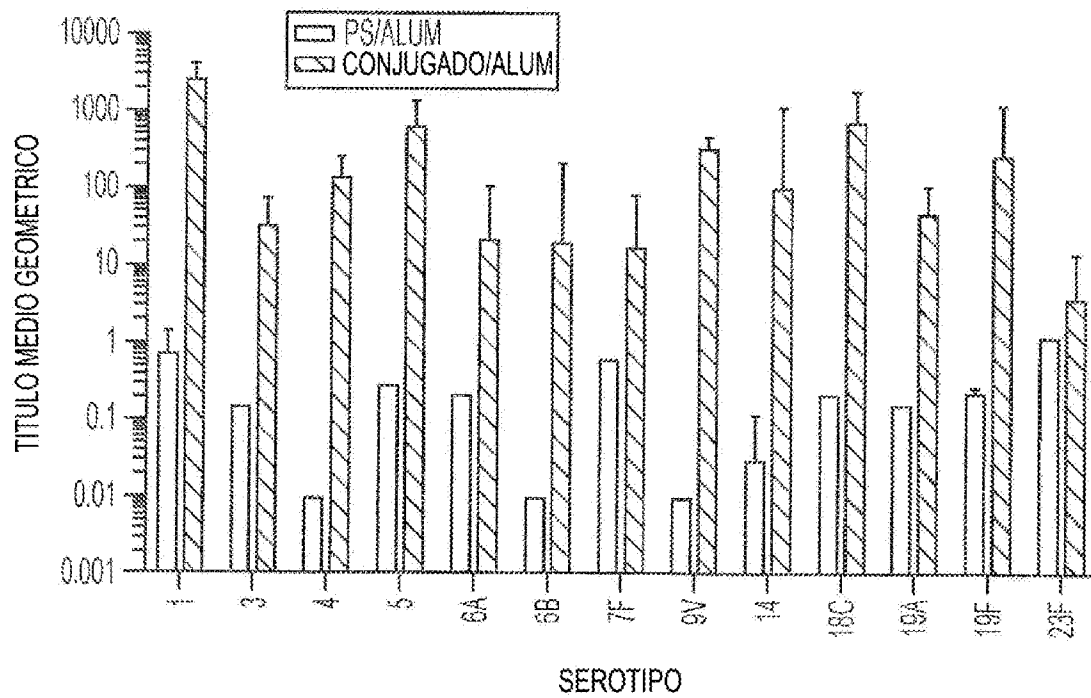


FIGURA 5

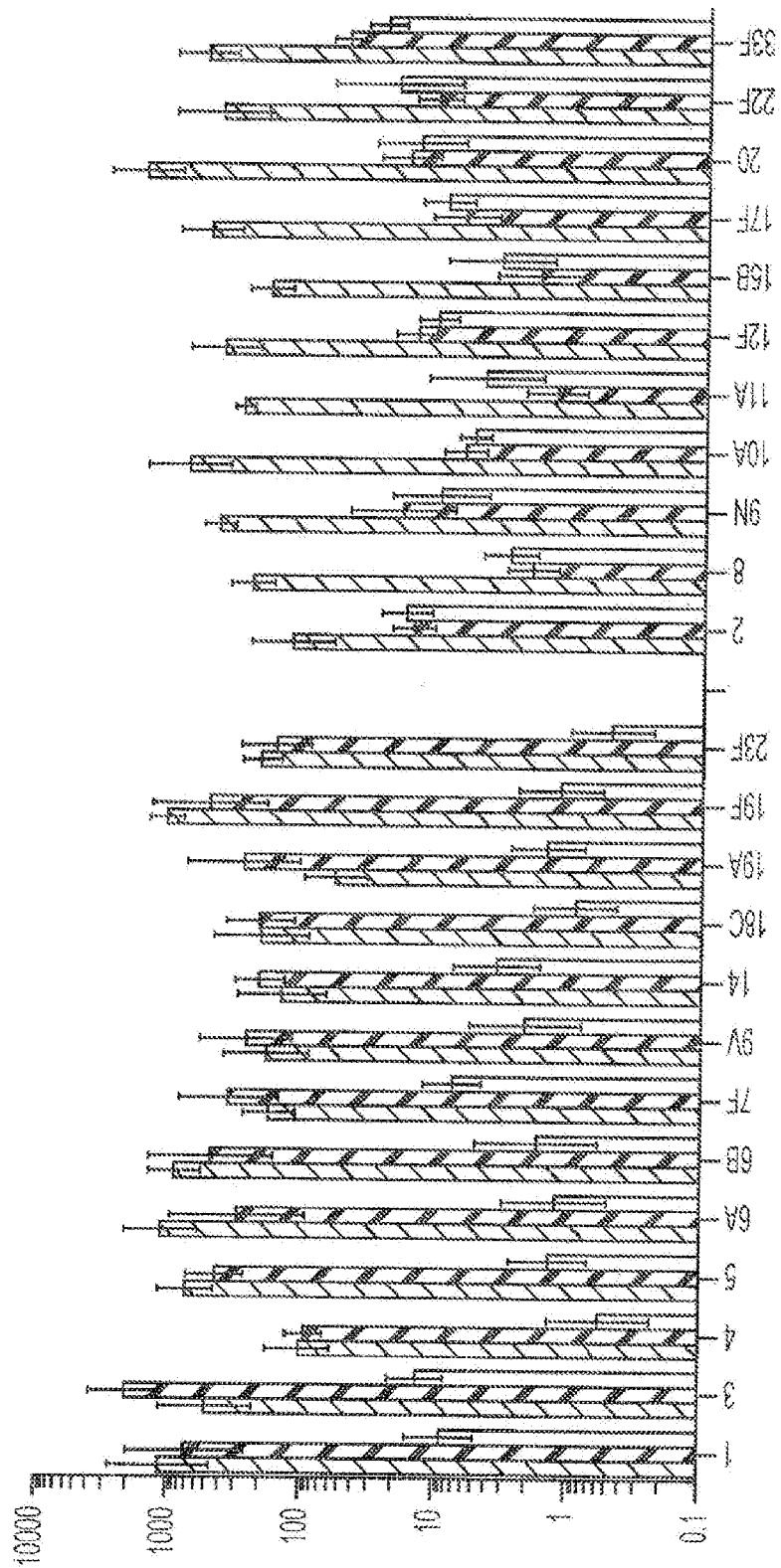


FIGURA 6

