

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 261 705**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2002 E 02755452 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **10.04.2013 EP 1401489**

54 Título: **Solubilización de polisacáridos capsulares**

30 Prioridad:

**20.06.2001 GB 0115176**

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

**22.07.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
LICHTSTRASSE 35  
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**COSTANTINO, PAOLO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 261 705 T5

## DESCRIPCIÓN

Solubilización de polisacáridos capsulares

**Campo técnico**

5 Esta invención está dentro del campo de las vacunas, en particular frente a la infección y enfermedad por meningococos.

**Antecedentes del tema**

10 *Neisseria meningitidis* es un patógeno humano Gram negativo. Coloniza la faringe, provocando meningitis y, ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis. Está estrechamente relacionado con *N. gonorrhoeae*, aunque una característica que diferencia meningococos claramente es la presencia de una cápsula de polisacáridos que está presente en todos los meningococos patógenos.

15 Se han identificado doce grupos serológicos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X y Z) de acuerdo con el polisacárido capsular del organismo. El grupo A es el patógeno implicado más frecuentemente en enfermedades epidémicas en el África sub-Sahariana. Los grupos serológicos B y C son responsables de la gran mayoría de casos en EE.UU. Y en la mayoría de países desarrollados. Los grupos serológicos W135 e Y son responsables de los casos restantes en EE.UU. y países desarrollados.

Los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* se preparan generalmente mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación del polisacárido (p.ej. utilizando un detergente catiónico), fraccionamiento en etanol, extracción fría de fenol (para eliminar proteínas) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [p.ej. referencia 1].

20 Una vacuna tetravalente de los polisacáridos de los grupos serológicos A, C, Y, y W135 se conoce hace años [2, 3] y se ha autorizado para uso humano. Aunque efectiva en adolescentes y adultos, induce una respuesta inmune pobre y corta duración de la protección y no se puede utilizar en niños [p.ej. 4]. Esto es porque los polisacáridos son antígenos independientes de la célula T que inducen una respuesta inmune débil que no se puede estimular. Los polisacáridos en esta vacuna no están conjugados y están presentes a una relación 1:1:1:1. MENCEVAX ACWY™ contiene 50 µg de cada polisacárido purificado una vez reconstituido de su forma liofilizada.

25 Se han aprobado también los oligosacáridos del grupo serológico C conjugados para su utilización en humanos [p.ej. Menjugate™; referencia 6]. Sin embargo, se mantiene la necesidad de realizar mejoras en las vacunas conjugadas contra los grupos serológicos A, W135 e Y, y en su manufactura.

**Descripción de la invención**

30 La invención proporciona un procedimiento para la conjugación de un polisacárido capsular bacteriano con una proteína portadora según la reivindicación 1. El conjugado se puede utilizar para preparar vacunas conjugadas, en particular contra los grupo serológicos A, W135 e Y de *N. meningitidis*.

Precipitación y disolución por etanol

35 Se conocen en el campo muchas técnicas para la precipitación de polisacáridos solubles. Los métodos de la presente invención utilizan uno o más detergentes catiónicos. El detergente es bromuro de cetiltrimetilamonio ("CTAB") [8]. CTAB se conoce también como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de cetrimonio, Cetavlon y Centimida.

Los polisacáridos capsulares se liberan al medio durante el cultivo. Por consiguiente, el material de partida para la precipitación será generalmente el sobrenadante de un cultivo bacteriano centrifugado o será un cultivo concentrado.

40 La etapa de precipitación puede ser selectiva para polisacáridos, pero se coprecipitarán generalmente otros componentes (p. ej. proteínas, ácidos nucleicos, etc.).

El polisacárido precipitado se puede recoger por centrifugación antes de su disolución.

45 Tras su precipitación, el polisacárido (formando un complejo con el detergente catiónico generalmente) se disuelve usando etanol. Se usa un disolvente que sea relativamente selectivo para el polisacárido con el fin de minimizar los contaminantes (p. ej. proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Se ha encontrado que el etanol es ventajoso a este respecto, y es altamente selectivo para el complejo CTAB-polisacárido.

Se añade etanol al polisacárido precipitado para obtener una concentración final de etanol (en base al contenido total de etanol y agua) de entre 75% y 95%. La concentración final óptima de etanol puede depender del grupo serológico de la bacteria de la que se obtiene el polisacárido.

50 El etanol se puede añadir al polisacárido precipitado en forma pura o se puede añadir en una forma diluida con un disolvente miscible (p. ej. agua). Las mezclas de disolventes preferidas son mezclas de etanol: agua, en una relación

preferida de entre alrededor de 70:30 y alrededor de 95:5 (p. ej. 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

Comparado con el procedimiento convencional para preparar polisacáridos capsulares, el procedimiento de precipitación en dos etapas seguido por extracción con etanol es más rápido y más simple.

- 5 Contrastando con el procedimiento descrito en la referencia 9, el procedimiento utiliza detergentes catiónicos en lugar de detergentes aniónicos. A diferencia del procedimiento de la referencia 10, el polisacárido se redisuelve utilizando etanol, en lugar de por intercambio de cationes utilizando sales de calcio o magnesio. A diferencia del procedimiento de la ref. 11, la precipitación no requiere un soporte inerte poroso. Además, a diferencia de los procedimientos anteriores del campo, se utiliza alcohol para redissolver el polisacárido en lugar de precipitarlo.

El polisacárido capsular bacteriano será de *N. meningitidis*, grupos serológicos A, W135 o Y.

## 10 Procesamiento adicional del polisacárido disuelto

El polisacárido se trata adicionalmente para eliminar contaminantes tras su disolución. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso una contaminación menor no es aceptable (p. ej. para la producción de vacunas humanas). Esto requerirá una o más etapas de filtración. La filtración es filtración por tamaño y/o ultrafiltración.

- 15 Una vez filtrado para eliminar contaminantes, el polisacárido se puede precipitar para su tratamiento adicional y/o procesamiento. Esto se puede llevar a cabo convenientemente por intercambio de cationes (p. ej. por la adición de calcio o sales de sodio).

El polisacárido se puede modificar químicamente. Por ejemplo, se puede modificar para reemplazar uno o más grupos hidroxilo con grupos bloqueantes. Esto es particularmente útil para MenA [12].

- 20 El polisacárido (modificado opcionalmente) se hidrolizará generalmente para formar oligosacáridos. Esto se realiza preferiblemente para dar un grado medio final de polimerización (GP) en el oligosacárido menor 30 (p. ej. entre 10 y 20, preferiblemente alrededor de 10 para el grupo serológico A; entre 15 y 25 para los grupos serológicos W135 e Y, preferiblemente alrededor de 15-20; etc.). Se prefieren los oligosacáridos a los polisacáridos para su utilización en vacunas. GP se puede medir convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [14].

- 25 Si se realiza hidrólisis, el hidrolizado será generalmente separado por tamaño para eliminar oligosacáridos de corta longitud. Esto se puede llevar a cabo de varias formas, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico. Se eliminan preferiblemente los oligosacáridos con un grado de polimerización menor o igual de aproximadamente 6 para el grupo serológico A, y aquellos menores de aproximadamente 4 se eliminan preferiblemente para los grupos serológicos W135 e Y.

- 30 Para aumentar la inmunogenicidad, los polisacáridos u oligosacáridos de la invención se conjugan a un portador (Figura 4). La conjugación a proteínas portadoras es particularmente útil para las vacunas pediátricas [p. ej. referencia 15] y es una técnica bien conocida [p. ej. revisada en las referencias 16 a 24, etc.].

La proteína portadora es un toxoide diftérico CRM<sub>197</sub> [25, 26, 27].

- 35 Se prefieren conjugados con una relación sacárido: proteína (p/p) de entre 0,5:1 (esto es, exceso de proteína) y 5:1 (esto es, exceso de sacárido), y se prefieren más aquellas con un relación entre 1:1,25 y 1:2,5.

Una única proteína portadora puede llevar múltiples sacáridos diferentes [39]. Los conjugados se pueden utilizar junto con una proteína portadora libre [40].

- 40 Se puede utilizar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado cuando sea necesario.

El sacárido será activado o hecho funcional antes de la conjugación. La activación puede incluir, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (p. ej. 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [41, 42]. Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidas, hidracinas, ésteres activos, norborneno, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; ver también la introducción a la referencia 22).

- 45 Las uniones vía un grupo conector se pueden llevar a cabo utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 43 y 44. Un tipo de ligamiento incluye aminación reductiva del polisacárido, acoplando el grupo amino resultante con un extremo del grupo conector de ácido adípico, y acoplando entonces una proteína al otro extremo del grupo conector de ácido adípico [20, 45, 46]. Otros conectores incluyen B-propionamida [47], nitrofenil-etilamina [48], haluros de haloacilo [49], uniones glucosídicas [50], ácido 6-aminocaproico [51], ADH [52], grupos C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [53], etc. Se puede utilizar unión directa como una alternativa a la utilización de un conector. Las uniones directas a la proteína pueden incluir oxidación del polisacárido seguida por aminación reductiva con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 54 y 55.

Se prefiere un procedimiento que incluya la introducción de grupos amino en el sacárido (p. ej. reemplazando grupos =O terminales con -NH<sub>2</sub>) seguido por derivación con un diéster adípico (p. ej. N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y reacción con la proteína portadora.

- 5 Tras la conjugación, se pueden separar los sacáridos libres y conjugados. Existen muchos métodos adecuados entre los que se incluyen cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [ver también las referencias 56 y 57].

#### Composiciones inmunogénicas y vacunas

- 10 Los conjugados de la invención son particularmente adecuados para su inclusión en composiciones inmunogénicas y vacunas. Un procedimiento de la invención puede por tanto incluir la etapa de formulación del conjugado como una composición inmunogénica o vacuna.

- 15 Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la invención, además de sacáridos meningocócicos, incluirán generalmente "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que reciba la composición. Los vehículos adecuados son generalmente macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa [121], agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas), partículas virales inactivas. Tales vehículos son bien conocidos por aquellos que trabajan habitualmente en el campo. Las vacunas pueden contener también diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras de pH, y similares. Una discusión detallada de excipientes aceptables farmacéuticamente está disponible en la referencia 122.

- 25 Las composiciones inmunogénicas utilizadas como vacunas incluyen una cantidad efectiva del sacárido antigénico, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según necesidad. Por "cantidad inmunológicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que va a ser tratado, edad, grupo taxonómico del individuo que va a ser tratado (p. ej. primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica por doctor que atiende, y de otros factores relevantes. Es esperable que la cantidad caiga dentro de un rango relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. La dosificación del tratamiento se puede realizar en una pauta de una única dosis o en una pauta de múltiples dosis (p. ej. Incluyendo dosis de recuerdo).

La vacuna se puede administrar conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores.

- 35 La vacuna puede incluir un adyuvante. Los adyuvantes preferidos para potenciar la efectividad de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alum), tales como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [Capítulos 8 y 9 en la referencia 123]; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como muramilpéptidos [Muramilpéptidos incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.] o componentes de paredes bacterianas), como por ejemplo (a) MF59<sup>TM</sup> [Capítulo 10 en la referencia 123; 124, 125], que contiene 5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85 (opcionalmente conteniendo MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador, (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado con pluronic, y thr-MDP bien en una emulsión submicrométrica por la acción de microfluidificador o en una emulsión de partículas de mayor tamaño por la acción de un agitador "vortex", y (c) sistemas de adyuvante Ribi<sup>TM</sup> (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de Escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de paredes bacterianas del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared bacteriana (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>); (3) adyuvantes de saponina [capítulo 22 de la referencia 123], tales como QS21 o Stimulon<sup>TM</sup> (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), bien en forma sencilla o en forma de partículas generadas de ellos tales como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores; capítulo 23 de la referencia 123), cuyos ISCOMs podrían estar desprovistos de detergente adicional p. ej. referencia 126; (4) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (p. ej. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [127], etc.), interferones (p. ej. interferón gama), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-deacilado (3dMPL) p. ej. referencias 128 y 129, opcionalmente en la ausencia sustancial de sales de aluminio cuando se usa con sacáridos de pneumococo p. ej. referencia 130; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua p. ej. referencias 131, 132 y 133; (8) oligonucleótidos que incluyen motivos CpG (Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3: 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS USA*, 1997, 94: 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.* 1998, 160: 870-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med.* 1997, 186: 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27: 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, *Vaccine*, 1988, 16: 1216-1224; Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374: 546-549; Klinman *et al.*, *PNAS USA*, 1996, 93: 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 1840-1845;

Cowdery *et al.*, *J. Immunol.* 1996, 156: 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell. Immunol.*, 1996, 167: 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79: 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147: 1759-1764; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160: 4755-4761; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160: 5898-5906; Solicitudes de patentes internacionales WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581) esto es, que contienen al menos un dinucleótido CG, con 5-metilcitosina opcionalmente en lugar de citosina; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno p. ej. referencia 134; (9) un surfactante éster sorbitan polioxietileno en combinación con octoxinol [135] o un éter alquil polioxietileno o éster surfactante en combinación con al menos un surfactante adicional no iónico tal como un octoxinol [136]; (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (p. ej. un oligonucleótido CpG) [137]; (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica p. ej. ref. 138; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua p. ej. ref. 139; (13) una saponina (p. ej. QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) p. ej. ref. 140; (14) enterotoxina lábil al calor de *E. coli* ("LT"), o mutantes no tóxicos de la misma, tales como los mutantes K63 o R72 [p. ej. Capítulo 5 de ref. 141]; (15) toxina colérica ("CT"), o mutantes no tóxicos de la misma [p. ej. Capítulo 5 de ref. 141]; (16) liposomas [Capítulos 13 y 14 de ref. 123]; (17) quitosán [p. ej. 142]; (18) RNA de doble hélice; (19) micropartículas (p. ej. una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30 µm, y más preferiblemente de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formada por materiales que son biodegradables y no tóxicos (p. ej. un poli(ácido α-hidroxi) tal como un poli(láctido-co-glicolido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhidrido, una policaprolactona, etc.) opcionalmente tratados para tener una superficie negativamente cargada (p. ej. con SDS) o una superficie positivamente cargada (p. ej. un detergente catiónico, tal como CTAB); o (20) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para aumentar la efectividad de la composición [p. ej. Capítulo 7 de ref. 123].

Se prefieren las sales de aluminio (especialmente fosfatos y/o hidróxidos de aluminio) y MF59. Cuando se usa un fosfato de aluminio, es posible adsorber uno o más de los sacáridos a la sal de aluminio, pero es preferible no adsorber los sacáridos a la sal, y esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en solución (p. ej. mediante la utilización de un tampón fosfato). Cuando se utiliza un hidróxido de aluminio, es preferible adsorber los sacáridos a la sal. La utilización de hidróxido de aluminio como adyuvante es particularmente ventajosa para los sacáridos del grupo serológico A.

En composiciones es posible adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio y tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. En el caso de combinaciones tetravalentes de los grupos serológicos de *N. meningitidis*, por ejemplo, están disponibles las siguientes permutaciones:

Grupo serológico	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinaciones trivalentes de los grupos serológicos de *N. meningitidis*, están disponibles las siguientes permutaciones:

Grupo serológico	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al individuo. Los individuos a tratar pueden ser animales; en particular, se pueden tratar individuos humanos. Las vacunas son particularmente útiles para vacunar a niños y adolescentes. Se pueden administrar por vías sistémicas o de mucosas.

Típicamente, las composiciones inmunogénicas se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o como suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para obtener soluciones o suspensiones en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas para favorecer el efecto adyuvante. La administración directa de las composiciones será en general por vía parenteral (p. ej. por inyección, bien subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o administrada en el espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdermales o transcutáneas (p. ej. véase la referencia 143), agujas e "hyposprays". La dosificación del tratamiento puede ser en una pauta de una única dosis o en una pauta de múltiples dosis (p.ej. incluyendo dosis de recuerdo).

Las vacunas de la invención son preferiblemente estériles. Están preferiblemente libres de pirógenos. Están

preferiblemente tamponadas p. ej. entre pH 6 y pH 8, preferiblemente pH 7. Cuando la vacuna incluya una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere la utilización de un tampón histidina [144].

- 5 Las vacunas de la invención pueden incluir bajos niveles (p. ej. < 0,01 %) de un detergente (p. ej. un Tween, tal como Tween 80). Las vacunas de la invención pueden incluir un polialcohol (p. ej. manitol) o trehalosa p. ej. a aproximadamente 15 mg/ml, particularmente si tienen que estar liofilizadas.

Las dosis óptimas de antígenos individuales se puede determinar empíricamente. En general, sin embargo, los antígenos sacáridos de la invención se administrarán a una dosis de entre 0,1 y 100 µg de cada sacárido por dosis, con un volumen de dosis típico de 0,5 ml. Generalmente la dosis es entre 5 y 20 µg por dosis de sacárido. Estos valores se miden como sacárido.

- 10 De acuerdo a la invención las vacunas pueden ser profilácticas (esto es, para prevenir la infección) o terapéuticas (esto es, para tratar la enfermedad después de la infección), pero generalmente son profilácticas.

Las vacunas se pueden probar en modelos animales estándar (p. ej. ver ref. 145).

La invención proporciona también un procedimiento según la reivindicación 11.

#### Definiciones

- 15 Los términos “que comprende” significan “que incluye” así como que “que consiste” p. ej. una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional p. ej. X + Y.

El término “aproximadamente” en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

#### **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra el efecto de las variaciones de la relación etanol: agua en la solubilización de los polisacáridos.

- 20 La figura 2 es una curva de calibrado obtenida mediante el análisis de muestras de polisacárido MenA a diferentes tiempos de hidrólisis. La curva muestra la relación lineal entre el recíproco del grado de polimerización y la capacidad de rotación óptica.

- 25 La figura 3 es una curva de calibración obtenida utilizando el ensayo de muestras de polisacárido MenY a diferentes tiempos de hidrólisis. La curva muestra la relación lineal entre el logaritmo del grado de polimerización y KD (coeficiente de distribución).

La figura 4 ilustra la preparación de un conjugado oligosacárido.

#### **Formas para la realización de la invención**

##### A. Producción y purificación de polisacáridos meningocócicos

- 30 Los meningococos de los grupo serológicos A, W135 e Y se crecieron en frascos de 500 ml que contenían 150 ml de medio Franz A, durante 12h a  $35 \pm 1^\circ \text{C}$ . Se estableció agitación a 150 rpm utilizando un agitador orbital de 35 mm. Después se inocularon 85 ml en un fermentador de 20 l que contenía medio Watson.

- 35 Después de 18,5 horas (W135 e Y) o 16,5 horas (A), cuando se alcanzó una OD = 10, se interrumpió la fermentación por la adición de 300 ml de formalina y entonces, tras 2 horas de incubación, el fermentador se enfrió a  $10^\circ \text{C}$ . Se recogió el sobrenadante por centrifugación seguido de filtración (0,22 µm) y ultrafiltración con una membrana de 30 kDa.

- 40 El polisacárido concentrado crudo se precipitó por adición de una solución de 100 mg/ml de CTAB en agua. Los volúmenes añadidos se muestran en la tabla siguiente. Tras 12 horas a temperatura ambiente, los complejos CTAB se recuperaron por centrifugación. El complejo CTAB se extrajo por adición de una solución de 95% de etanol a temperatura ambiente durante 16-20 horas bajo agitación vigorosa. El volumen de etanol añadido se muestra en la tabla siguiente:

Grupo serológico	Volumen de CTAB (ml)	Volumen de 95% de etanol (litros por Kg de pasta seca)
A	475	3,5 a 6
W135	200	4 a 6
Y	650	3,4

Las suspensiones resultantes se filtraron a través de un filtro CUNO de 10 SP de profundidad. El filtrado se recirculó a través de un cartucho CUNO zetacarbon™ hasta una  $\text{OD}_{275\text{nm}} < 0,2$ . El filtrado de Z carbono se recogió entonces y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. El polisacárido se precipitó finalmente de la fase de etanol por adición de una solución de  $\text{CaCl}_2$  2M en agua (de 10-12 ml/l de EtOH solución final). El polisacárido purificado se obtuvo por

centrifugación, se lavó con 95% de etanol y se secó bajo vacío.

En otros experimentos, se modificó la concentración final de etanol utilizada para la extracción (Figura 1). Para el polisacárido del grupo serológico A, el rango de etanol más efectivo fue entre 80 y 95%, con una eficiencia de extracción decreciente a porcentajes menores. Para el grupo serológico W135, se alcanzó una buena extracción con entre el 75% y el 95% de etanol, siendo 95% menos efectivo. Para el grupo serológico Y, los mejores resultados se obtuvieron con etanol entre el 75% y el 85%, siendo altos porcentajes (p. ej. 90%, 95%) menos efectivos. En general, se observó que los porcentajes de etanol por debajo de los expuestos aquí tendían a incrementar la co-extracción de contaminantes tales como proteínas. Los porcentajes de etanol dados en este párrafo se expresaron como concentración final (etanol como porcentaje del volumen total de etanol + agua) y se basan en un contenido de agua en las pastas de CTAB-polisacárido recuperadas por centrifugación de aproximadamente el 50% (esto es, 500g de H<sub>2</sub>O por Kg de pasta seca). Este valor se determinó empíricamente en experimentos a pequeña escala.

## B. Conjugación de los polisacáridos del grupo serológico A

### a) Hidrólisis

El polisacárido del grupo serológico A meningocócico se hidrolizó en 50 mM de tampón acetato sódico, pH 4,7 durante aproximadamente 3 horas a 37°C. La hidrólisis se controló con el fin de obtener oligosacáridos con un grado medio de polimerización (GP) de aproximadamente 10, como se determinó por la relación (p/p) entre el fósforo orgánico total y el fosfato monoéster.

La relación DP (de fósforo orgánico total) a (fósforo monoéster) es inversamente proporcional a la capacidad de rotación óptica ( $\alpha$ ), como se muestra en la Figura 2. Esta relación se puede utilizar para medir la extensión de la hidrólisis más convenientemente que las medidas directas de fósforo.

### b) Selección por tamaño

Esta etapa elimina los oligosacáridos de corta longitud generados durante el procedimiento de hidrólisis. El hidrolizado obtenido anteriormente se ultrafiltró a través de una membrana con un límite de exclusión de 30 kDa (12 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM, pH 6,5). El retenido, que contiene los productos de alto peso molecular (PM), se descartó. El permeado se cargó en una columna Q-Sepharose Fast Flow equilibrada en tampón acetato 5 mM, pH 6,5. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado, después con 10 VC de tampón acetato 5 mM/NaCl 125 mM, pH 6,5 con el fin de eliminar oligosacáridos con GP  $\leq$  6. El oligosacárido seleccionado por tamaño se eluyó entonces con 5 VC de tampón acetato 5 mM/NaCl 0,5 M, pH 6,5.

La población de oligosacáridos eluidos tenía un GP medio de aproximadamente 15.

### c) Introducción de un grupo amino primario en el extremo reductor

Se añadió una sal de amonio (acetato o cloruro) a la disolución del oligosacárido seleccionado por tamaño a una concentración final en un intervalo de 49-300 g/l, posteriormente se añadió ciano borohidruro de sodio a una concentración final en un intervalo de 12-73 g/l. Después de ajustar el pH entre 6-7.3, la mezcla se incubó a 37° C durante 5 días.

Los amino-oligosacáridos se purificaron entonces por ultrafiltración de flujo tangencial o con una membrana con un límite de exclusión de un 1kDa ó 3kDa utilizando 13 volúmenes de diafiltración de NaCl 0,5 M seguido por 7 volúmenes de diafiltración de NaCl 20 mM. El contenido de fósforo (una actividad química del antígeno) de la solución de amino-oligosacárido purificada se analizó por el procedimiento de la ref. 146 y la cantidad de grupos amino introducidos por el procedimiento de la ref. 147.

Los oligosacáridos purificados se secaron entonces en un evaporador rotatorio para eliminar el agua.

### d) Derivación a éster activo

Los amino-oligosacáridos secados se solubilizaron en agua destilada a una concentración de grupos amino 40 mM, entonces se añadieron 9 volúmenes de DMSO seguidos por trietilamina a una concentración final de 200 mM. A la solución resultante se le añadió N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico a una concentración de 480 mM

La reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, entonces el oligosacárido activado se precipitó con acetona (concentración final de 80% v/v). El precipitado se recuperó por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para eliminar el N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico y productos secundarios. Finalmente, el oligosacárido activado se secó bajo vacío.

La cantidad de grupos éster activos introducidos en la estructura del oligosacárido se determinó por un método colorimétrico como se describió en la ref. 148.

### e) Conjugación a CRM<sub>197</sub>

El oligosacárido activado seco se añadió a una solución de 45 mg/ml de CRM<sub>197</sub> en tampón fosfato 0,01M, pH 7,2 para una relación de éster/ proteína (mol/mol) de 12:1. La reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente toda la noche. Después de este periodo, el conjugado se purificó por cromatografía hidrofóbica o ultrafiltración de flujo tangencial. El conjugado MenA-CRM<sub>197</sub> se esterilizó por filtración y se almacenó a -20° C ó -60° C hasta la formulación de la vacuna.

El conjugado se analizó para: contenido proteico (ensayo de proteínas micro BCA), contenido de sacárido MenA (análisis colorimétrico de fósforo), contenido de sacárido libre, perfil en HPLC (en TSKgel G4000SW 7,5 mm ID x 30 cm), y SDS-PAGE. Las características de las preparaciones típicas se muestran en la tabla siguiente:

Código del lote	Sacárido mg/ml	Proteína (mg/ml)	Glucosilación	KD
210201/A	0,257	0,864	0,3	0,489
210201/BS	0,308	1,354	0,23	0,503
210201/BL	0,28	1,482	0,19	0,501
35I230595	0,138	0,3	0,46	
010900	0,092	0,337	0,27	
DP29	0,105	0,245	0,43	
A1 (no seleccionado por tamaño)	0,08	0,291	0,27	
A2 (seleccionado por tamaño)	0,446	2,421	0,18	

### C. Conjugación de polisacáridos del grupo serológico W135

#### a) Hidrólisis

El polisacárido de grupo meningocócico W se hidrolizó en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4,7 durante aproximadamente 3 horas a 80° C. Esto resultó en oligosacáridos con un GP medio de aproximadamente 15 a 20 según se determinó por la relación entre ácido siálico (AS) y AS reducido terminal.

La relación de GP (AS total) a (AS reducido terminal) está relacionada con la KD determinada por HPLC-SEC, como se muestra en la Figura 3. Esta relación se puede utilizar para monitorizar la extensión de la hidrólisis de forma más conveniente que las medidas directas de AS.

#### b) Separación por tamaño

El hidrolizado se ultrafiltró a través de una membrana con un límite de exclusión de 30 kDa (12 a 20 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM/NaCl 15-30 mM, pH 6,5). La fracción retenida, que contiene los productos de alto PM, se descartó mientras que la fracción permeable se cargó en una columna Q-Sepharose Fast Flow equilibrada con tampón acetato 5 mM/ NaCl 15 mM, pH 6,5. La columna se lavó entonces con 10 VC de tampón equilibrado, con el fin de eliminar oligosacáridos con GP ≤ 3-4 y se eluyó con 3 VC de tampón acetato 5 mM/NaCl 500 mM, pH 6,5.

#### c) Introducción de un grupo amino primario en el extremo reductor

Se añadió cloruro amónico o acetato amónico a la solución de oligosacáridos seleccionados por tamaño hasta una concentración final de 300 g/l, entonces se añadió ciano borohidruro de sodio a una concentración final de 49 g/l ó 73 g/l. La mezcla se incubó a 50° C durante 3 días.

Los amino-oligosacáridos se purificaron entonces por ultrafiltración de flujo tangencial como se describió para el serogrupo A. Se analizó el contenido de ácido siálico del material purificado (método colorimétrico de acuerdo a la ref. 149 y/o galactosa (HPLC) (actividades químicas del antígeno MenW135). Los oligosacáridos purificados se secaron con un evaporador rotatorio para eliminar el agua.

#### d) Derivación a éster activo

Los amino-oligosacáridos secos se derivaron como se describió anteriormente para el grupo serológico A.

#### e) Conjugación a CRM<sub>197</sub>

La conjugación se realizó como se describió anteriormente para el grupo serológico A pero, se utilizó diafiltración con una membrana de 30 kDa para purificar el conjugado (50 volúmenes de diafiltración de tampón fosfato 10 mM, pH 7,2). El conjugado purificado se esterilizó por filtración y se almacenó a -20° C ó -60° C hasta la formulación de la vacuna.

El conjugado se analizó para los mismos parámetros descritos anteriormente para el grupo serológico A. El contenido de sacárido MenW se analizó por determinación colorimétrica de ácido siálico:



Código del lote	Sacárido mg/ml	Proteína (mg/ml)	Glucosilación	KD
Lote 1	5,73	3,52	1,63	0,296
Lote 2/4,5	3,51	2,88	1,22	0,308
Lote 3S	2,49	2,25	1,11	0,380
Lote 3Sd	2,03	2,24	0,91	0,394
Lote 3L	2,32	2,3	1,01	0,391
Lote 3Ld	1,94	2,29	0,85	0,383
Lote 3S/pr. Glic6	0,363	0,82	0,44	0,498
Lote 3S/pr. Glic9	0,424	0,739	0,57	0,447
Lote 3S/pr. Glic12	0,479	0,714	0,671	0,414

#### D. Conjugación de polisacáridos del grupo serológico Y

##### a) Hidrólisis

5 El polisacárido meningocócico del grupo Y se hidrolizó como se describió anteriormente para el serogrupo W135. Esto generó oligosacáridos con un GP medio de aproximadamente 15 a 20 como se determinó por la relación entre AS y AS reducido terminal (medido indirectamente convenientemente como se describió bajo C(a) anteriormente).

##### b) Selección por tamaño, c) Introducción de grupos amino, d) Derivación a éster activo y e) Conjugación

Estas etapas se realizaron como se describió anteriormente para el grupo serológico W135. El conjugado purificado se esterilizó por filtración y se almacenó a -20° C ó -60° C hasta la formulación de la vacuna.

El conjugado se analizó de la misma forma que se describió anteriormente para el grupo serológico W135:

Código del lote	Sacárido mg/ml	Proteína (mg/ml)	Glucosilación	KD
Lote 1A	1,16	0,92	1,26	0,303
Lote 1B	4,57	3,55	1,29	0,339
Lote 2/4,5	2,32	6,1	0,38	0,467
Lote 2/6	1,75	5,73	0,3	0,498

#### 10 E. Oligosacáridos MenA, W135 e Y conjugados

La tabla siguiente muestra datos relativos a conjugados MenA, MenW135 y MenY apropiados para realizar combinación de composiciones de la invención:

	A	W135	Y
GP tras selección por tamaño	16,6	21,9	21,1
Relación sacárido/proteína	0,5	1,1	0,7
KD	0,44	0,36	0,41
Sacárido libre	5%	10%	5%
Proteína libre	< 2%	< 2%	< 2%

#### Referencias

- [1] Frash (1990). Advances in Biotechnological Processes (eds. Mizrahi & Van Wezel) 13: 123-145.
- 15 [2] Armand *et al.* (1982). J. Biol. Stand. 10: 335-339.
- [3] Cadoz *et al.* (1985). Vaccine 3:340-342.
- [4] MMWR (1997) 46 (RR-5) 1-10.
- [5] Baklaic *et al.* (1983). Infect. Immun. 42: 599-604.
- [6] Costantino *et al.* (1992). Vaccine 10: 691-698
- 20 [7] WO02/00249.
- [8] Inzana (1987). Infect. Immun. 55: 1573-1579.
- [9] WO98/32873
- [10] Patente EE.UU. 4.753.796.
- [11] Patente europea 0072513.

- [12] Solicitud de patente Reino Unido 0207117.3
- [13] Pon *et al.* (1997). J. Exp. Med. 185: 1929-1938.
- [14] Ravenscroft *et al.* (1999). Vaccine 17: 2802-2816.
- [15] Ramsay *et al.* (2001). Lancet 357 (9251): 195-196.
- 5 [16] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.
- [17] Buttery & Moxon (2000). J. R. Coll. Physicians Lond. 34: 163-168.
- [18] Ahmad & Chapnick (1999). Infect. Dis. Clin. North. Am. 13: 113-133, vii.
- [19] Goldblatt (1988). J. Med. Microbiol. 47: 563-567.
- [20] Patente europea 0477508.
- 10 [21] Patente EE.UU. 5.306.492.
- [22] WO98/42721.
- [23] Dick *et al.* (1989). Conjugate Vaccines (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel 10: 48-114.
- [24] Hermanson (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego ISBB: 0123423368
- [25] Anónimo (Enero 2002). Research Disclosure, 453077.
- 15 [26] Anderson (1983). Infect. Immun. 39 (1): 233-238.
- [27] Anderson *et al.* (1985). J. Clin. Invest. 76 (1): 52-59.
- [28] EP-A-0372501.
- [29] EP-A- 0378881.
- [30] EP-A- 0427347.
- 20 [31] WO93/17712.
- [32] WO94/03208
- [33] WO98/58668.
- [34] EP-A-0471177.
- [35] WO91/01146.
- 25 [36] Falugi *et al.* (2001). Eur. J. Immunol. 31:3816-3824.
- [37] WO00/56360.
- [38] WO00/61761.
- [39] WO99/42130.
- [40] WO96/40242.
- 30 [41] Lees *et al.* (1996). Vaccine 14: 190-198.
- [42] WO95/08348.
- [43] Patente EE.UU. 4.882.317.
- [44] Patente EE.UU. 4.695.624.
- [45] Mol. Immunol. (1985). 22: 907-919.
- 35 [46] EP-A-0208375.
- [47] WO00/10599.
- [48] Gevert *et al.* (1979). Med. Microbiol. Immunol. 165: 171-288.

- [49] Patente EE.UU. 4.057.685.
- [50] Patente EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [51] Patente EE.UU. 4.459.286.
- [52] Patente EE.UU. 4.965.338.
- 5 [53] Patente EE.UU. 4.663.160.
- [54] Patente EE.UU. 4.761.283.
- [55] Patente EE.UU. 4.356.170.
- [56] Lei *et al.* (2000). Dev. Biol. (Basel) 103: 259-264.
- [57] WO00/38711.; Patente EE.UU. 6.146.902.
- 10 [121] WO00/56365.
- [122] Gennaro (2000). Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th ed ISBN: 0683306472.
- [123] Vaccine Design...(1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [124] WO90/14837.
- [125] Patente EE.UU. 6.299.884.
- 15 [126] WO00/07621.
- [127] WO99/44636.
- [128] GB-2220221.
- [129] EP-A-0689454.
- [130] WO00/56358.
- 20 [131] EP-A-0835318.
- [132] EP-A-0735898.
- [133] EP-A-0761231.
- [134] WO99/52549.
- [135] WO01/21207.
- 25 [136] WO01/21152.
- [137] WO00/62800.
- [138] WO00/23105.
- [139] WO99/11241.
- [140] WO98/57659.
- 30 [141] Del Giudice *et al.* (1998). Molecular Aspects of Medicine, vol.19, number 1.
- [142] WO99/27960.
- [143] WO98/20734.
- [144] Solicitud de Patente Reino Unido 0118249.2.
- [145] WO01/30390.
- 35 [146] Chen *et al.* (1956). Anal. Chem. 28: 1756-1758.
- [147] Habeeb *et al.* (1966). Anal. Biochem. 14: 328-336.
- [148] Miron & Wilchek (1982). Anal. Biochem. 126: 433-435..

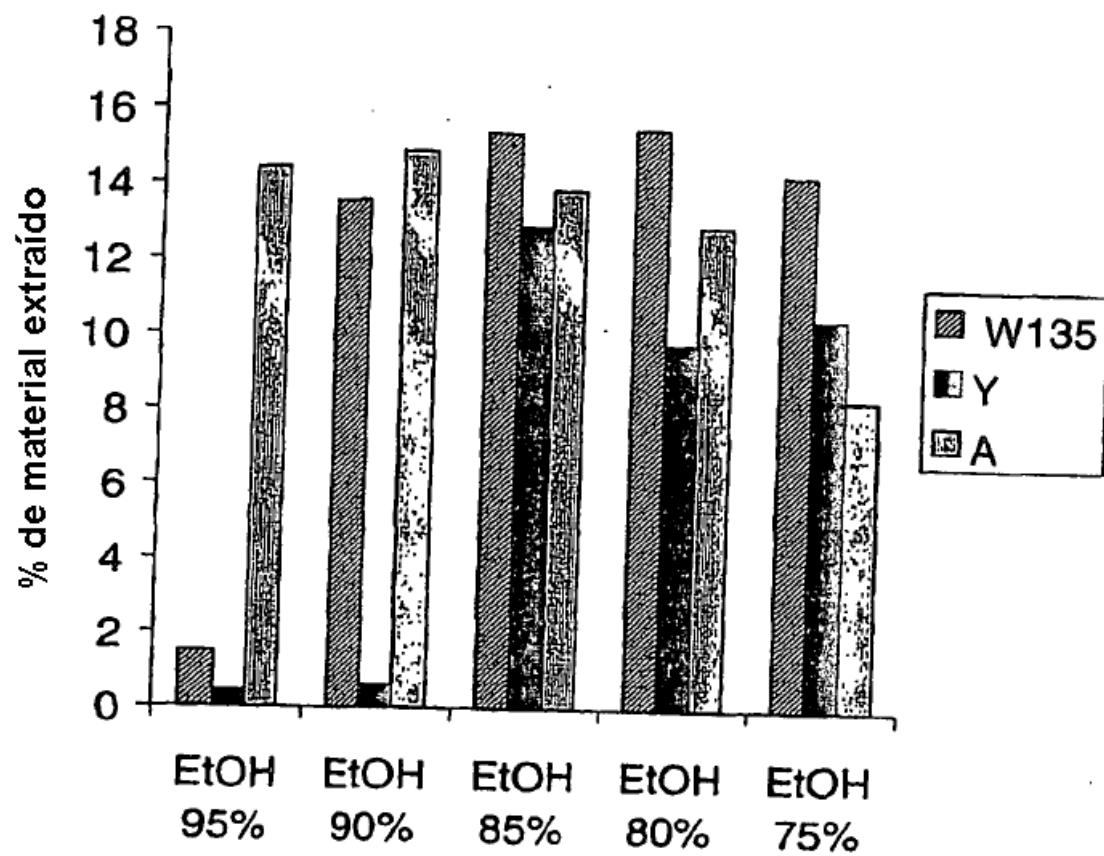
[149] Svennerholm (1957). Biochem. Biophys. Acta 24: 604-611.

[150] Carlone *et al.* (1992). J. Clin. Microbiol. 30:154-159.

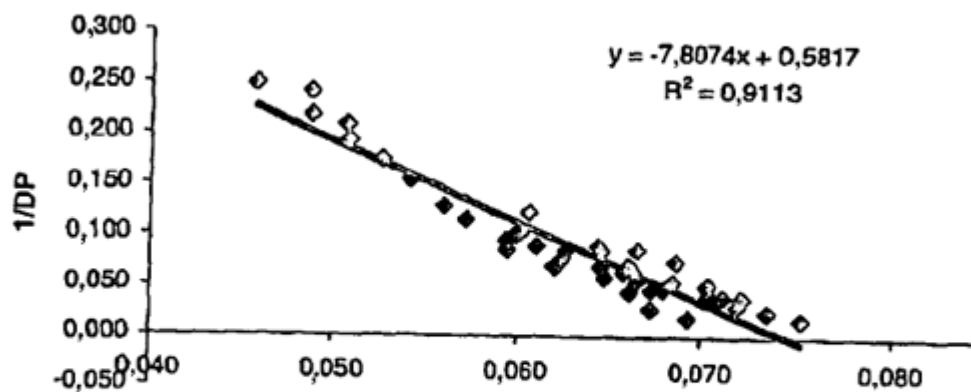
# REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la conjugación de un polisacárido capsular bacteriano a una proteína portadora, que comprende  
5 purificar el polisacárido, que comprende las etapas de (a) precipitación del polisacárido usando uno o más detergentes catiónicos, seguido por (b) solubilización del polisacárido precipitado usando etanol a una concentración final de entre 75% y 95%, entonces (c) tratar el polisacárido solubilizado obtenido en la etapa (b) para eliminar contaminantes, que comprende filtración por tamaño y/o ultrafiltración, activación o funcionalización del polisacárido, y  
10 conjugación del polisacárido a una proteína portadora, en el que la proteína portadora es un toxoide diftérico CRM<sub>197</sub>,  
y en el que el polisacárido capsular bacteriano es del grupo serológico A, W135 o Y de *N. meningitidis* y el detergente catiónico es bromuro de cetiltrimetilamonio.
2. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el polisacárido obtenido en la etapa (b) o la etapa (c) es posteriormente precipitado.
- 15 3. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la etapa de hidrólisis para formar oligosacáridos.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además la etapa de selección por tamaño con el fin de eliminar los oligosacáridos de corta longitud.
- 20 5. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la etapa de mezclado con otras moléculas biológicas.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que las moléculas biológicas adicionales se seleccionan entre el grupo constituido por: antígenos sacarídicos del grupo serológico C de *N. meningitidis*, y antígenos proteicos del grupo serológico B de *N. meningitidis*.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que los antígenos sacarídicos de las cepas A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis* están mezclados.
8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la(s) etapa(s) de formulación de vacuna.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en la que la(s) etapa(s) de formulación de vacuna comprende(n) la mezcla del/de los sacárido(s) antigénico(s) con un adyuvante.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el adyuvante es un fosfato de aluminio y/o un hidróxido de aluminio.
11. Un procedimiento para conjugar a una proteína portadora un polisacárido capsular bacteriano que se ha precipitado usando uno o más detergentes catiónicos y solubilizado entonces usando etanol como disolvente a una concentración final de entre 75% y 95% y tratado entonces para eliminar contaminantes, que comprende filtración por tamaño y/o ultrafiltración, y activado o funcionalizado, en el que el polisacárido capsular bacteriano es del grupo serológico A, W135 o Y de *N. meningitidis*, y en el que la proteína portadora es un toxoide diftérico CRM<sub>197</sub> y el detergente catiónico es bromuro de cetiltrimetilamonio.
- 35 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el etanol está en forma de una mezcla de etanol:agua 95:5.

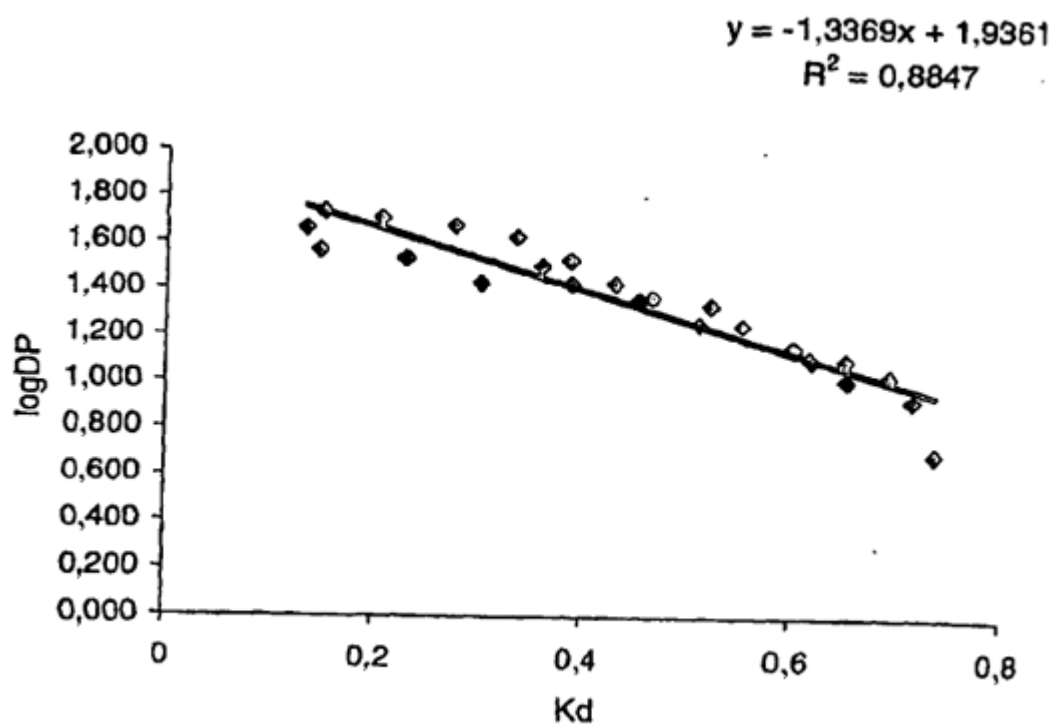
40

**FIGURA 1**

**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

