

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 180**

51 Int. Cl.:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>C07D 211/18</b> | (2006.01) |
| <b>C07K 17/10</b>  | (2006.01) |
| <b>C08B 37/02</b>  | (2006.01) |
| <b>C08B 37/00</b>  | (2006.01) |
| <b>C08H 1/00</b>   | (2006.01) |
| <b>A61K 47/61</b>  | (2007.01) |
| <b>A61K 47/64</b>  | (2007.01) |
| <b>A61P 31/00</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 31/04</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 37/04</b>  | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/US2010/061133**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084705**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10842660 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2022 EP 2513056**

54 Título: **Reactivos químicos para la activación de polisacáridos en la preparación de vacunas conjugadas**

30 Prioridad:

**17.12.2009 US 287593 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.05.2022**

73 Titular/es:

**SERUM INSTITUTE OF INDIA PVT. LTD. (100.0%)  
212/2, Hadapsar, Off Soli Poonawalla Road  
Pune 411 028, IN**

72 Inventor/es:

**LEES, ANDREW**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

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

ES 2 913 180 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

Reactivos químicos para la activación de polisacáridos en la preparación de vacunas conjugadas

5 Estado de la técnica anterior

1. Campo de la invención

10 La presente invención está dirigida a reactivos y métodos de conjugación de proteínas a carbohidratos y, en particular, a los procesos y productos químicos utilizados en la fabricación de vacunas, y también a las vacunas fabricadas por medio del proceso.

2. Descripción del estado de la técnica

15 Las vacunas que contienen proteína unida covalentemente a carbohidrato han demostrado tener un éxito notable en la inducción de una respuesta inmunitaria al resto carbohidrato. Algunos ejemplos de tales vacunas, conocidas como "conjugados" están disponibles para *Haemophilus influenzae* tipo b (por ejemplo, ActHib, Hiberix), *Neisseria meningitidis* tipos A, C, W e Y (por ejemplo, Menactra) y *S. pneumoniae* (por ejemplo, Prevnar, Synflorix). Para que la proteína se una al carbohidrato, generalmente este último necesita ser activado de modo que pueda hacerse reaccionar con la proteína, tanto directamente o por medio de un espaciador (Dick, W.E. Jr y Beurret, M. Glyconjugates of bacterial carbohydrate antigens. A survey and consideration of design and preparation factors. In: Conjugate Vaccines (Eds Cruse, J.M. y Lewis, R.E.). Karger, Basel, 1989. Un medio de activación es a través de la oxidación del carbohidrato para producir aldehídos, que entonces se unen a lisinas en la proteína por medio de aminación reductora. En otros casos, la proteína se funcionaliza en primer lugar con hidrazidas o grupos aminooxi, que a continuación se hacen reaccionar con aldehídos en el carbohidrato (Lees, A. Use of amino-oxy functional groups in the preparation of protein-polysaccharide (PS) conjugate vaccines, Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2005/0169941).

20 Otro método de para activar polisacáridos es con el uso de bromuro de cianógeno, para formar un ciano-éster en el polisacárido que a continuación se hace reaccionar con una molécula espaciadora, tal como dihidrazida adípica. Después, el polisacárido funcionalizado se hace reaccionar con la proteína. Los métodos mejorados para la cianación de polisacáridos utilizan tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina (CDAP) (Lees, A., Producing immunogenic constructs using soluble carbohidratos activated via organic cyanylating reagents. Patentes de Estados Unidos N.º 5.651.971; 5.693.326; y 5.849.301). El CDAP permite que la proteína se una directamente al polisacárido. El CDAP también puede utilizarse para funcionalizar el polisacárido con un espaciador, que posteriormente se une a la proteína. Las proteínas funcionalizadas con hidrazida o aminooxi también pueden unirse a polisacáridos activados con CDAP (Patente de Estados Unidos N.º 5.849.301).

30 El documento WO96/17941 de BIONEBRASKA se refiere a modificaciones de productos de proteína recombinante destinadas a una aplicación terapéutica; más en particular a proteína activadora con reactivo de S-cianilación tetrafluoroborato de 1-ciano-4-pirrolidinpiridinio (CPPT).

35 Zuber et al. (1993) J. Am. Chem. Soc., 115(11): 4939 - 4940 se refiere a la ligadura de ADN con moléculas efectoras sintéticas. La reacción de ligadura entre ADN y la molécula sintética se realiza en presencia de un cofactor, 1-cianoimidazol (1-CI).

40 La Patente WO2007/109129 de US GOV HEALTH & HUMAN SERVICES desvela la preparación de conjugados a partir de carbohidratos activados. Los carbohidratos se activan mediante reacción con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) mediante la activación del polisacárido por medio de la introducción de un grupo cianato en el grupo hidroxilo.

45 Kim J-J. et al. (2005) Tetrahedron 61: 5889 - 5984 es un artículo de investigación que describe la síntesis y la aplicación de una nueva categoría de agentes de cianación electrófilos (2-cianopiridazin-3(2H)-onas). Se sintetizó una diversidad de agentes diferentes con esta clase de compuesto. Posteriormente, se sometió a ensayo la actividad de algunos de los compuestos sobre moléculas orgánicas pequeñas (nucleófilos de aminas, azufre y carbono) para determinar los rendimientos y las eficiencias de la reacción de cianación.

50 El documento WO95/08348 de HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE desvela un método para preparar una vacuna que comprende en un constructo inmunogénico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende activar al menos un primer resto que contiene carbohidrato con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP) y tetrafluoroborato de N-cianotrietilamonio (CTEA); y unir covalentemente el resto que contiene carbohidrato activado a otro resto.

Sumario de la invención

65 La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

La presente invención supera los problemas y desventajas asociadas con las estrategias y diseños actuales en la fabricación de vacunas y proporciona nuevas herramientas y métodos de conjugación de proteínas, especialmente para la fabricación de vacunas.

En consecuencia, la invención proporciona un proceso según se establece en la reivindicación 1. El compuesto químico puede ser un carbohidrato natural o sintético, un polisacárido, un oligosacárido o una combinación de los mismos. El segundo compuesto puede ser un péptido, un polipéptido o una proteína, que puede ser una molécula antigénica. La conjugación puede ser directa o indirectamente con la adición de grupos funcionales que facilitan la conjugación. Preferentemente, el proceso comprende además retirar componentes con un peso molecular inferior al del conjugado, por ejemplo, mediante filtración por diálisis, cromatografía o una combinación de los mismos. Preferentemente, el conjugado resultante es una vacuna o un agente de diagnóstico. El proceso puede comprender además incluir un compuesto enlazador entre el compuesto activado y el segundo compuesto. Preferentemente, las etapas del proceso, así como la inclusión de un enlazador, se realizan juntas, pero cada una puede realizarse independientemente.

En el presente documento se describe una vacuna producida mediante los procesos de la invención. Preferentemente, dicha vacuna comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable que puede incluir, pero sin limitación, agua, solución salina, alcohol, sacáridos, polisacáridos, aceite o combinaciones de los mismos.

Otras realizaciones y ventajas de la invención se exponen, en parte, en la siguiente descripción, y en parte, pueden ser obvias a partir de esta descripción o pueden aprenderse de la práctica de la invención.

#### Descripción de los dibujos

Figura 1. Cromatograma superpuesto de BSA/CDAP/dextrano y BSA/CPPT/dextrano realizado en una columna de filtración en gel Superdex200 (1 x 30 cm).

Figura 2. Análisis de HPLC SEC de conjugación directa a polisacárido funcionalizado utilizando 1-CI.

Figura 3. Cromatograma del conjugado CRM(1-CI/Ps6A) en Superdex200.

Figura 4. Análisis de HPLC SEC de fracciones de Superdex 200.

Figura 5. Estructuras químicas de CPPT (tetrafluorborato de 1-ciano-4-pirrolidinopiridinio; también denominado CPIP), 1-CBT (1-cianobenzotriazol), 1-CI (1-cianoimidazol) y 2-CPO (2-cianopiridazin-3(2H)ona).

#### Descripción de la invención

Una realización de la invención está dirigida a un proceso de conjugación de un carbohidrato, polisacárido, oligosacárido o una combinación de los mismos que comprende mezclar CPPT, 1-CBT, 1-CI o 2-CPO, o un derivado funcional o una modificación conservativa de cualquiera de los compuestos precedentes, con el carbohidrato, polisacárido, oligosacárido o combinación de los mismos para crear un compuesto químico activado. El compuesto activado se mezcla con un segundo compuesto para crear un conjugado. Estas etapas pueden realizarse de forma independiente o conjunta, y puede incluir otro compuesto como enlazador entre los dos. Preferentemente, el compuesto activado se mezcla con una molécula enlazadora que a continuación se hace reaccionar un segundo compuesto para crear un conjugado. Los enlazadores preferidos incluyen, pero sin limitación, hexanodiamina, etilendiamina, hidrazina, dihidrazida adípica o 1,6-diaminooxihexano.

La conjugación puede ser directa o indirecta, lo que significa con o sin la adición de grupos funcionales que facilitan la conjugación. El carbohidrato, polisacárido, oligosacárido o una combinación de los mismos puede ser natural o sintético. Preferentemente, el segundo compuesto es un péptido, un polipéptido o una proteína, y más preferentemente el segundo compuesto es una molécula antigénica para la preparación de una vacuna o como reactivo de diagnóstico.

Esta invención proporciona nuevos reactivos para polisacáridos de cianación en soluciones acuosas o parcialmente acuosas que pueden unirse covalentemente a proteínas o a través de un espaciador. Los ejemplos ilustran el uso de estos reactivos con una diversidad de polisacáridos y proteínas que muestran que los métodos son generalmente aplicables.

En la presente solicitud, carbohidrato, polisacárido y oligosacárido se utilizan de un modo intercambiable. El método puede emplear carbohidratos naturales o sintéticos.

La proteína puede referirse a un material natural, recombinante o sintético. Puede incluir péptidos. Otras moléculas además de la proteína pueden utilizarse como segundo resto para unir directa o indirectamente al carbohidrato activado.

Conjugación directa se refiere a la unión de la proteína al carbohidrato activado sin introducir grupos funcionales adicionales. Conjugación directa se refiere a la adición de grupos funcionales que se utilizan para facilitar la conjugación. Por ejemplos, el carbohidrato puede funcionalizarse con aminas que a continuación se hacen reaccionar

con grupos bromoacetilo. Después, el carbohidrato bromoacetilado se hace reaccionar con proteína tiolada. (Hermanson, GT, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 2ª ed., 2008). El término "funcionalización" se refiere generalmente a unir químicamente un grupo para añadir funcionalidad, por ejemplo, para facilitar la funcionalización. Los ejemplos incluyen la funcionalización de proteínas con hidrazidas o grupos aminooxi y la funcionalización de carbohidrato con grupos amino.

#### Métodos y reactivos

La conjugación de la proteína con el carbohidrato aumenta su peso molecular, que se puede controlar utilizando cromatografía analítica por exclusión de tamaño (HPLC SEC). Cuanto antes se eluya el material, mayor será el peso molecular, y la proteína se controla generalmente por medio de su absorbancia a 280 nm. Por lo tanto, el desplazamiento de la absorbancia a un tiempo anterior es una indicación de un aumento en el peso molecular y, por lo tanto, de la conjugación. Se usó una columna BioSep G4000 SEC (Phenomenex) o similar para la HPLC SEC en un sistema Waters 600 equipado con el software Empower.

Las aminas y las hidrazidas se analizaron utilizando TNBS como se describe de un modo general en: "Spectrophotometric determination of hydrazine, hydrazides, and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid" Qi XY, Keyhani NO, Lee YC. Anal Biochem. 15 de nov. de 1988;175(1):139-44 (incorporado por referencia) y Vidal y Franci, J Immun. Meth 86:155, 1986.

La concentración de proteína se determinó a partir de su coeficiente de extinción y absorbancia a 280 nm. El carbohidrato se sometió a ensayo mediante el método de Monsigny M. et al. (Anal Biochem. 175(2):525-30, 1988).

El tetrafluoroborato de 1-ciano-4-pirrolidinpiridinio (CPPT) fue preparado por Wilmington PharmaTech, Lt. N.º 1795-1536-10 y tenía una pureza superior al 97 % según se determinó por HPLC de fase inversa (véase la Figura 5). El tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina (CDAP) fue proporcionado por Merck Kga. El 1-ciano-imidazol (1-CI) se adquirió de Apin Chemicals (Abingdon, RU) (véase la Figura 5). El 1-ciano-benzenotriazol (1-CBT) se adquirió de Sigma Aldrich (véase la Figura 5). El CRM y el toxoide tetánico fueron proporcionados por el Serum Institute of India (Pune). El BSA se adquirió de Amresco (Solon, OH). Los polisacáridos neumocócicos se obtuvieron del Serum Institute of India o el ATCC (Manassas, VA). Los polisacáridos de Hib PRP y Neisseria meningitidis se obtuvieron del Serum Institute of India. El dextrano T2000 (GE Healthcare) se fraccionó utilizando una columna de filtración en gel S400HR (GE Healthcare) para preparar una fracción de alto peso molecular. Otros reactivos utilizados incluyen: N-metil-2-pirrolidona (NMP), hexanodiamina.2HCl y trietilamina (TEA) eran de Sigma-Aldrich. El acetonitrilo era de GFS Chemical.

Los siguientes ejemplos ilustran realización de la invención.

Ejemplo 1: Sistema modelo: Como sistema modelo, se unió covalentemente BSA al polisacárido dextrano, tanto directamente como a través de un espaciador.

Cada uno de CDAP y CPPT se llevó a 0,43 M en acetonitrilo y se añadieron 120 µl a 2 ml de dextrano (6 mg/ml en solución salina + 0,02 % de azida sódica). Después de 30 segundos, se añadió trietilamina a cada uno (~7 µl) para mantener el pH a aproximadamente un pH de 9,8. A los 2 min, se retiraron alícuotas de 1 ml del dextrano activado y se añadieron a 1 ml de una solución 0,5 M de hexanodiamina o a una solución de 1 ml de BSA (10 mg/ml). Después de 4 horas, las soluciones de dextrano derivatizadas con hexanodiamina se dializaron durante una noche en solución salina con cambios frecuentes. Para retirar más cantidad de reactivos de bajo peso molecular, cada una de las soluciones se llevó a ~6 ml, se concentró utilizando un dispositivo de filtro de centrifugación Corning (límite de Spin-X de 10 kDa) y se repitió el proceso. El filtrado de la segunda centrifugación se analizó utilizando ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y se encontró que era esencialmente negativo para aminas. El retentado desalado se analizó en cuanto a aminas y dextrano. Los conjugados de BSA-dextrano se incubaron durante una noche a 4 °C y después se fraccionaron en columna de exclusión por tamaño Superdex200 (GE Healthcare), equilibrada con PBS. El perfil de elusión para los dos conjugados se muestra en la Figura 1. El pico de volumen vacío se combinó y se analizó para BSA y dextrano (véase la Tabla 1).

Tabla 1

| Activador | mg BSA/mg Dex | NH <sub>2</sub> /100 kDa Dex |
|-----------|---------------|------------------------------|
| CDAP      | 0,71          | 59                           |
| CPPT      | 0,90          | 78                           |
|           |               |                              |

Estos datos muestran que el CPPT activa el dextrano tan bien como el CDAP y posiblemente mejor. Esto demuestra que la proteína puede conjugarse directamente con el polisacárido activado con CPPT.

Ejemplo 2: Funcionalización de polisacáridos con aminas utilizando CPPT

Se prepararon soluciones de 7,5 mg/ml de polisacáridos capsulares de Haemophilus influenza (Hib), Neisseria meningitidis A (MenA) y Neisseria meningitidis C (MenC). A 1,35 ml de cada una, se añadieron 75 µl de CPPT a 100 mg/ml en acetonitrilo. A los 30 segundos, se añadieron 5 µl de TEA a los polisacáridos de Hib y MenA. Se añadieron 6 µl de TEA a la solución de MenC. A los 2,5 min, se añadieron 0,6 ml del PS activado a 0,6 ml de hexanodiamina 0,5 M. Después de 3 h, cada una se dializó extensamente frente a una solución salina.

Cada solución se sometió a ensayo para el polisacárido utilizando el ensayo de ácido resorcinol sulfúrico con el polisacárido correspondiente como patrón para MenA y MenC. Se utilizó ribosa como patrón para el polisacárido de Hib, con 1 mol de ribosa por unidad de repetición y un PM de unidad de repetición de 243 g/mol (véase la Tabla 2).

| Polisacárido | NH <sub>2</sub> /100 kDa |
|--------------|--------------------------|
| Hib          | 38                       |
| MenA         | 19,5                     |
| MenC         | 13                       |

Esta tabla ilustra además el uso de CPPT para funcionalizar una diversidad de polisacáridos.

Ejemplo 3: Derivatización de dextrano, un polisacárido modelo, utilizando 1-cianoimidazol

Se añadieron 30 mg de 1-CI a 2 ml de solución 20 mg/ml de dextrano T2000 (GE Healthcare). Se añadieron cinco alícuotas de 100 µl de trietilamina 0,2 M para mantener el pH a 9-9,2. Después de aproximadamente, se añadieron 2 ml de hexanodiamina 0,5 M y el pH se ajustó a 9 con NaOH 0,5 M. Después de 2 h de reacción, la solución se dializó exhaustivamente en solución salina. La solución se clarificó mediante centrifugación y se sometió a ensayo para dextrano y aminas. Se encontró que el producto contenía 27 aminas/100 kDa de dextrano, lo que demuestra que el 1-CI puede utilizarse para funcionalizar polisacáridos con aminas.

Ejemplo 4: Conjugación directa de una proteína modelo a un PS modelo utilizando 1-CI (BSA-dextrano)

Se preparó una solución de 13,5 mg/ml de dextrano de alto peso molecular. Se añadieron 67,5 µl de una solución 100 mg/ml de 1-CI en NMP a 1 ml y 30 segundos después, se añadieron 4 alícuotas de 100 µl cada una de TEA 0,2 M, seguido de aproximadamente 20 µl de NaOH 0,5 M. Aproximadamente a los 3,5 min, se añadieron 0,5 ml de una solución 20 mg/ml de BSA. El pH se elevó a aproximadamente 8,5 mediante la adición de 2 alícuotas de 100 µl cada una de borato sódico 0,1 M, pH 9,0. Después de dos días a 4 °C, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC SEC. La figura muestra ahora que el dextrano activado con BSA + 1-CI ahora se eluye mucho antes de la columna de exclusión por tamaño, lo que indica un peso molecular mayor debido a la conjugación con el polisacárido.

Ejemplo 5: Activación de otro PS con 1-CI

Se prepararon polisacáridos capsulares a partir de PS del serotipo neumocócico 1 (Ps1) y PS 6B (Ps6B) a 10 mg/ml en solución salina + 0,02 % de azida sódica. Se añadieron 9,3 mg de 1-CI suspendido en 93 µl de NMP a 1 ml de Ps1, seguido de 8 alícuotas de 100 µl de TEA 0,2 M. A los 2,5 min, se añadieron 0,5 ml de hexanodiamina 1 M, seguido de 2 alícuotas de 100 µl cada una de NaOH 0,5 M. El pH fue de aproximadamente 9. Se añadieron 100 µl de una solución 100 mg/ml de 1-CI en NMP a 1 ml de la solución de Ps6B. Se añadieron dos alícuotas de 100 µl de TEA 0,2 M, seguido de 2 alícuotas de 50 µl cada una de NaOH 0,5 M para mantener el pH a ~9,5-10,8. A los 2,5 min, se añadieron 0,5 ml de hexanodiamina 1 M junto con 50 µl de NaOH 0,5 M. Después de aproximadamente 3 horas, cada una se dializó extensamente frente a una solución salina. Después, cada uno se ensayó para polisacáridos utilizando el ensayo de ácido resorcinol sulfúrico y para aminas utilizando TNBS (véase la Tabla 3).

|                      | Aminas/100 kDa PS |
|----------------------|-------------------|
| Ps1-NH <sub>2</sub>  | 9,8               |
| Ps6B-NH <sub>2</sub> | 4,5               |

Por lo tanto, está claro que puede utilizarse 1-CI para activar y funcionalizar polisacáridos.

Ejemplo 6: Conjugación indirecta a polisacárido funcionalizado utilizando 1-CI

Se añadieron 239 µl de HEPES 1 M, pH 8, a una solución de aproximadamente 9,5 mg en 2,2 ml del Ps6B-NH<sub>2</sub> preparado en el Ejemplo 5. Se añadieron 170 µl de bromoacetato de NHS 0,1 M en NMP. Después de 1 h, la solución se desaló por medio de repetidos lavados utilizando un filtro centrífugo Amicon Ultra15 de 30 kDa de límite, utilizando 10 mM de NaPO<sub>4</sub> + 5 mM de tampón de EDTA de pH 6,8. Después, el retentado se llevó a un volumen final de aproximadamente 0,7 ml. El toxoide tetánico se tioló de la siguiente manera: Se llevaron 571 µl de toxoide tetánico (35 mg/ml) a pH 8 mediante la adición de 64 µl de HEPES 1 M. Se añadieron lentamente 27 µl de SPDP 0,1 M en NMP. Después de aproximadamente 2 h, el pH se redujo a 5,7 y se añadieron 33 µl de DTT 0,5 M para desproteger

el tiol. Después de 30 min, la solución se desaló en una columna G25 de 1x15 cm, se equilibró con 10 mM de NaPO<sub>4</sub> + 5 mM de tampón de EDTA de pH 6,8. El volumen final se combinó y se concentró a una concentración final de aproximadamente 62 mg/ml. El contenido de tiol se determinó utilizando DTNB. El tétanos tenía una proporción de aproximadamente 6 moles de tioles/mol de TT. El polisacárido bromoacetilado y el TT tiolado se combinaron de la siguiente manera: 0,66 ml de Ps6B-BrAc + 73 µl de HEPES 1 M, pH 8, + 230 µl de TT tiolado.

Se dejó que la reacción tuviera lugar durante una noche a 4 °C y después se analizó por HPLC SEC (Figura 2). El conjugado se fraccionó mediante filtración en gel en una columna de exclusión por tamaño S400HR (GE Healthcare). Las fracciones de volumen vacío, que contenían el material de alto peso molecular, se combinaron y se sometieron a ensayo para proteínas y carbohidratos. Se descubrió que el conjugado tenía aproximadamente 1 mg de TT por mg de Ps6. Esto indica que 1-Cl puede utilizarse para la conjugación indirecta de proteínas a carbohidratos.

Ejemplo 7: Conjugación directa de una proteína a polisacárido utilizando 1-Cl

Se disolvió polisacárido capsular de serotipo neumocócico 6A (Ps6A) en agua a 10 mg/ml. Cada uno de los 5 tubos de 1 ml se calentó a 80 °C durante 2 min y se añadió en cada uno 1 ml de borato sódico 0,1 M, pH 9. Después de 2,5 h, los tubos se enfriaron en hielo y después se dializaron. Se añadieron 25 µl de TEA a 10 ml del Ps6A hidrolizado a 5 mg/ml y se añadieron 50 mg de 1-Cl mientras se hacía vórtice. A los 2,5 min, se añadieron 30 ml de CRM a 17,2 mg/ml y el pH se mantuvo a aproximadamente 9. Después de una noche de reacción, la solución se concentró a aproximadamente 1 ml utilizando un dispositivo de centrifugación Amicon Ultra 15 de 30 kDa de límite. Se cargaron 0,5 ml en una columna Superdex 200 (1 x 30 cm), equilibrada con borato sódico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 9, y la columna se hizo funcionar a 0,5 ml/min. El cromatograma se muestra en la Figura 3. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y las fracciones selectivas se analizaron mediante HPLC SEC. Los cromatogramas de SEC se muestran en la Figura 4 e indican que todas las fracciones tuvieron un PM mayor que el CRM no conjugado. Como se muestra, todas las Fracciones 20-28 se eluyen antes que el CRM no conjugado, lo que indica que cada una es de un peso molecular mayor.

Ejemplo 8: Funcionalización de un polisacárido con 1-cianobenzotrazol (1-CBT)

Se suspendieron 12 mg de 1-CBT en 240 µl de acetonitrilo + 120 µl de NMP. Se añadieron 120 µl de 0,2 M a 0,5 ml de dextrano T2000 20 mg/ml (10 mg), seguido de la adición de 120 µl de la suspensión de 1-CBT. Aproximadamente a los 3 min, se añadieron 0,5 ml de hidrazida adípica 0,5 M. Después de 2 h de reacción, la solución se dializó extensivamente frente a solución salina durante 2 días. Después, la solución se centrifugó y se sometió a ensayo para dextrano e hidrazidas.

Se recuperaron aproximadamente 9,5 mg de dextrano con una proporción de aproximadamente 11 hidrazidas por 100 kDa de dextrano. Para confirmar que las hidrazidas estaban unidas al dextrano, se examinó una alícuota de hidrazida-dextrano marcada con TNBS por HPLC SEC con supervisión a 500 nm, donde se absorbe el aducto de TNBS-hidrazida. El cromatograma indicó que el trinitrobenzeno estaba asociado con el dextrano de alto peso molecular, lo que muestra que la hidrazida estaba efectivamente unida al dextrano. Esto muestra que 1-CBT puede utilizarse para funcionalizar polisacáridos.

Ejemplo 9: Conjugación directa de proteína a polisacárido activado con 1-CBT

Se añadieron 120 µl de TEA 0,2 M a 500 µl de una solución 20 mg/ml de dextrano T2000 y se añadieron 160 µl de una suspensión 50 mg/ml de 1-CBT en acetonitrilo. Aproximadamente a los 2 min, se añadieron 200 µl de una solución 47 mg/ml de BSA en solución salina y la solución se volvió más viscosa. Después de reaccionar durante una noche, el conjugado se analizó mediante HPLC SEC. La mayoría del BSA se eluyó en el volumen vacío de la columna, indicando que tenía un peso molecular alto. Esto demuestra que 1-CBT puede utilizarse para conjugar directamente proteínas a polisacáridos.

Ejemplo 10: Se sintetizan 2-cianopiridazin-3(2H)-onas seleccionadas (Véase Kim et al, Tetrahedron 61:5889, 2005) según se describe en Kim et al., para dar carbohidrato de cianato.

El carbohidrato se activa utilizando 2-CPO (X = Cl, Y = Cl) y después se hace reaccionar directamente con una proteína o se funcionaliza, por ejemplo, con grupos amino. El Reactivo 2a (Véase el Esquema 1 de Kim et al.) se prepara a 100 mg/ml en acetonitrilo y se añade a una solución 10 mg/ml de polisacárido neumocócico tipo 14 (Ps14) a una proporción de 1 mg de reactivo por 1 mg de carbohidrato. El pH se eleva a pH 9,5 utilizando trietilamina y se mantiene. Después de 2,5 min, se añade la mitad de la solución a un volumen igual de hexanodiamina 0,5 M y el pH se ajusta a aproximadamente 8. La otra mitad de la solución se combina con un peso igual de toxoide tetánico en una solución de 10 mg/ml. Después de incubación durante una noche a 4 °C, la solución de polisacárido de hexanodiamina se dializa extensamente frente a solución salina y después se somete a ensayo para aminas y polisacárido. Se encuentra una proporción de 10 aminas por 100 kDa de polisacárido. La solución de polisacárido de tétanos se fracciona en una columna S400HR (GE Healthcare) para eliminar la proteína no conjugada. Se determinan las concentraciones de proteína y polisacárido. Se encuentra una proporción de aproximadamente 0,75 mg de proteína por mg de polisacárido.

5 Otras realizaciones y usos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención descrita en el presente documento. La expresión "que comprende", dondequiera que se utilice, pretende incluir las expresiones "que consiste" y "que consiste esencialmente en". Además, no se pretende que las expresiones "que comprende", "que incluye" y "que contiene" sean limitantes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso de conjugación de un carbohidrato, polisacárido, oligosacárido o una combinación de los mismos que comprende:
- mezclar tetrafluorborato de 1-ciano-4-pirrolidinopiridinio (CPPT); 1-cianoimidazol (1-CI); 1-cianobenzotriazol (1-CBT) o 2-cianopiridazin-3(2H)ona (2-CPO) con el carbohidrato, polisacárido, oligosacárido o una combinación de los mismos para crear un compuesto químico activado; y  
10 mezclar el compuesto activado con un segundo compuesto para crear un conjugado.
2. Un proceso, según la reivindicación 1, en el que el carbohidrato, polisacárido, oligosacárido o una combinación de los mismos es natural o sintético.
- 15 3. Un proceso, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el segundo compuesto es un péptido, un polipéptido o una proteína.
4. Un proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el segundo compuesto es una molécula antigénica.
- 20 5. Un proceso, según cualquier reivindicación precedente, en el que la conjugación es directa o indirecta con la adición de grupos funcionales que facilitan la conjugación.
6. Un proceso, según cualquier reivindicación precedente, que comprende además retirar componentes con un peso molecular inferior al del conjugado mediante diálisis, filtración, cromatografía o una combinación de los mismos.
- 25 7. Un proceso, según reivindicación precedente, en el que el conjugado es una vacuna o un agente de diagnóstico.
8. Un proceso, según cualquier reivindicación precedente, que comprende además mezclar el compuesto activado con un compuesto enlazador para formar un grupo enlazador entre el compuesto activado y el segundo compuesto.
- 30 9. Un proceso, según la reivindicación 8, en el que el compuesto enlazador es hexanodiamina.
10. Un proceso, según la reivindicación 8, en el que el compuesto enlazador es etilendiamina.
- 35 11. Un proceso, según la reivindicación 8, en el que el compuesto enlazador es hidrazina.
12. Un proceso, según la reivindicación 8, en el que el compuesto enlazador es dihidrazida adípica.
13. Un proceso, según la reivindicación 8, en el que el compuesto enlazador es 1,6-diaminoxihexano.
- 40 14. Un proceso, según cualquier reivindicación precedente, donde las etapas se realizan juntas.
15. Una vacuna o agente de diagnóstico producido por un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

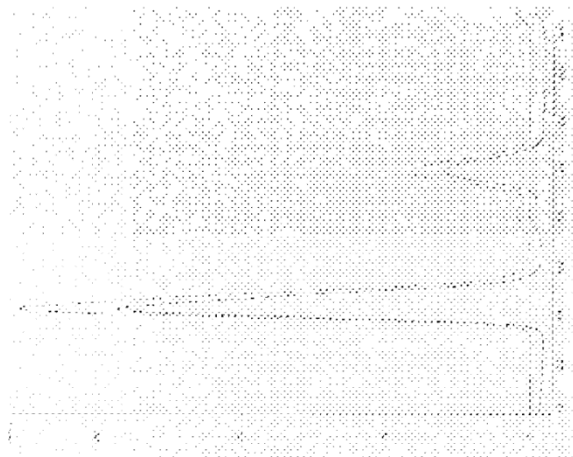


Figura 1

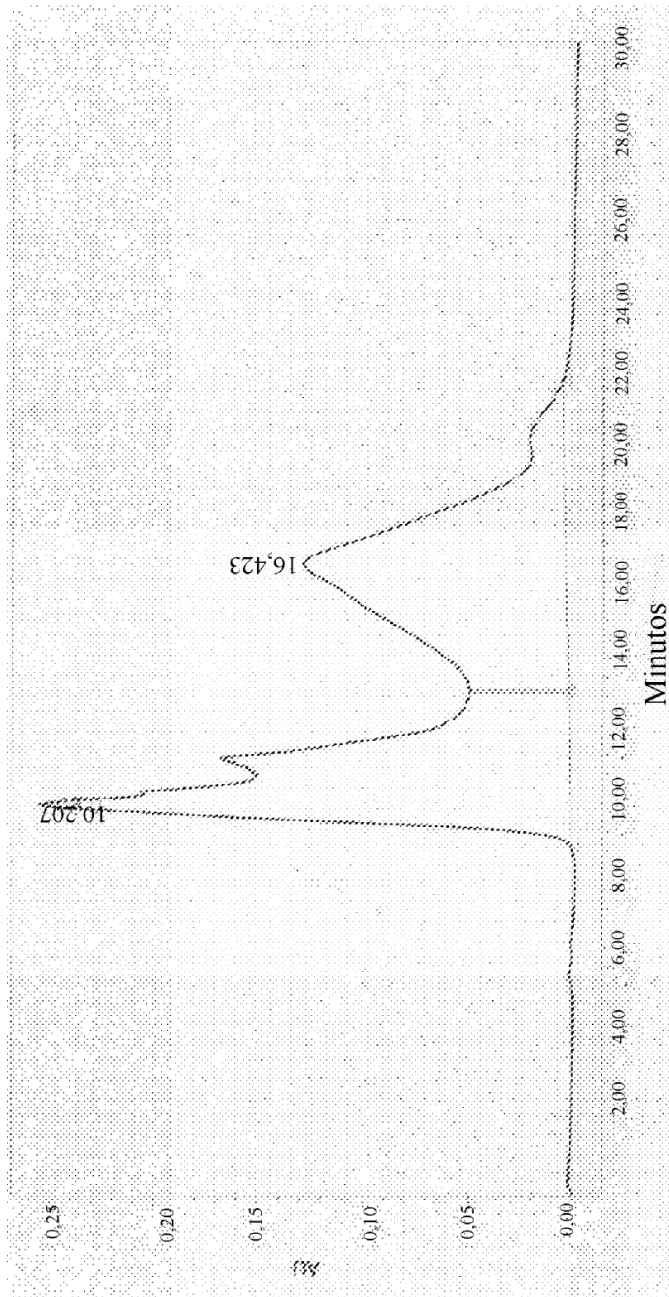


Figura 2

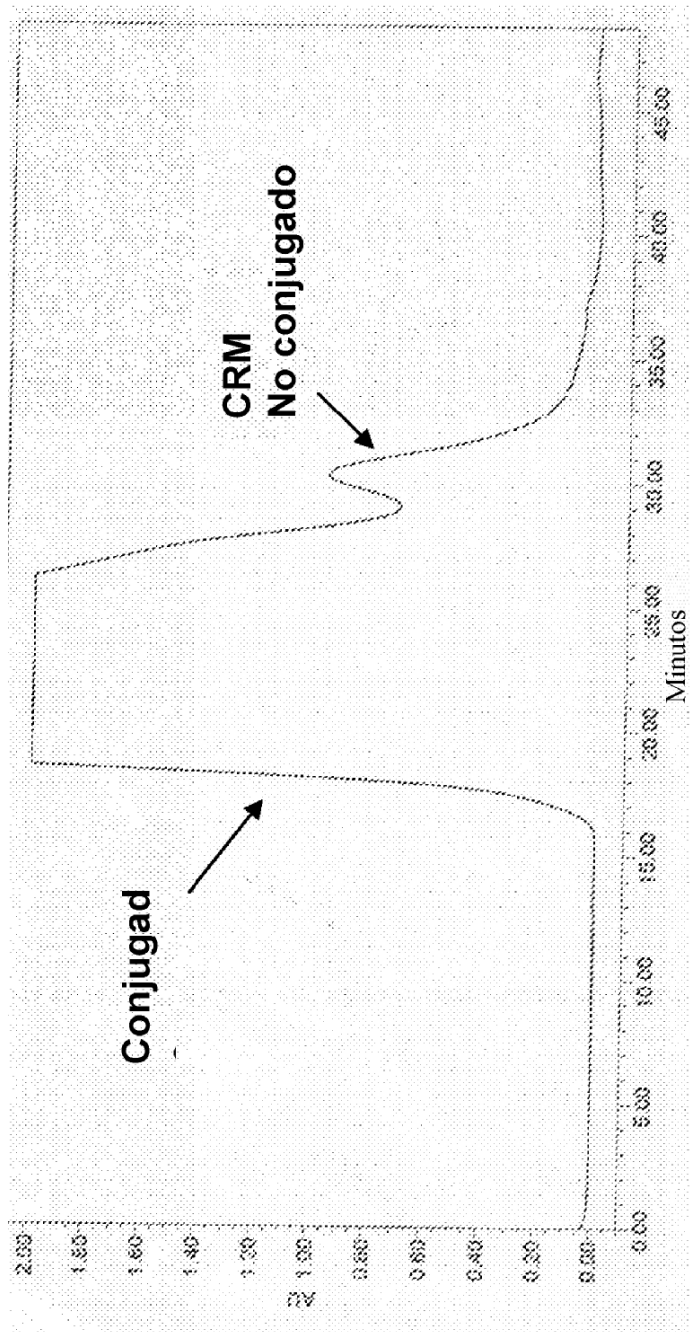


Figura 3

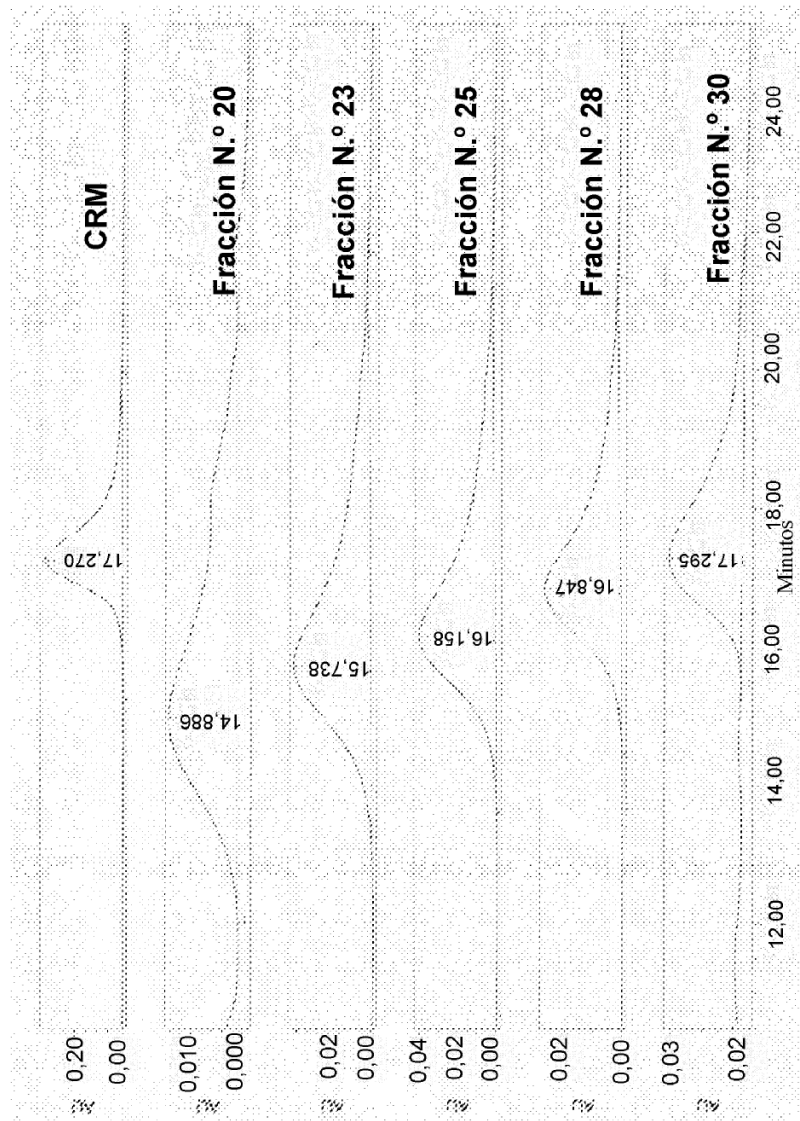


Figura 4

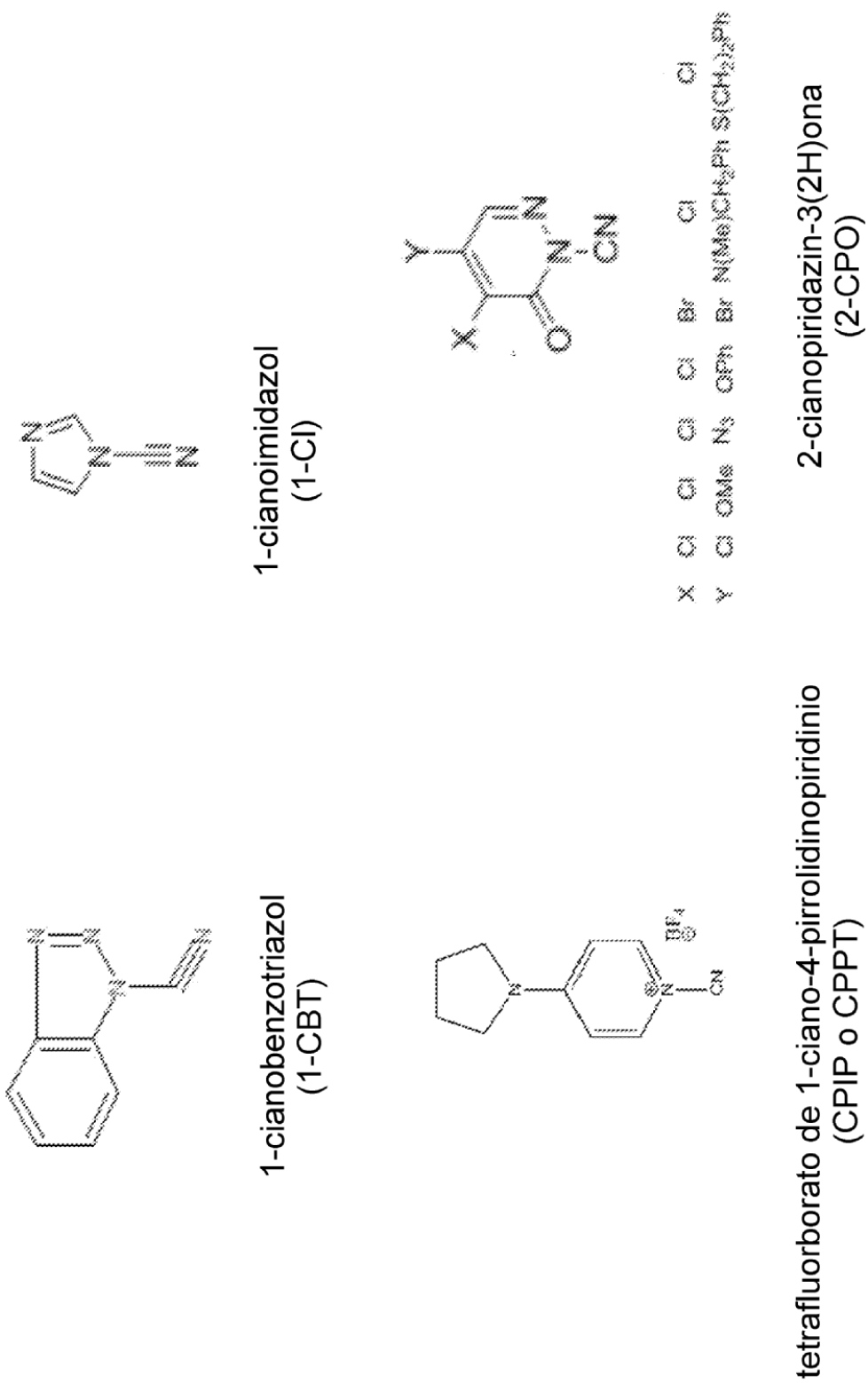


Figura 5