



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 121 820**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

(96) Número de solicitud europea: **92300655 .5**

(96) Fecha de presentación : **27.01.1992**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0497525**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.08.1992**

(54) Título: **Vacuna conjugada de polisacárido neumocócico.**

(30) Prioridad: **28.01.1991 US 646570**
19.12.1991 US 807942

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.12.1998**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **28.05.2010**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **28.05.2010**

(73) Titular/es: **Merck Sharp & Dohme Corp.**
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065, US

(72) Inventor/es: **Kniskern, Peter J.;**
Ip, Charlotte C.;
Hagopian, Arpi;
Hennessey, John P., Jr.;
Miller, William J.;
Kubek, Dennis J.;
Burke, Pamela D.;
Marburg, Stephen y
Tolman, Richard L.

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 121 820 T5

DESCRIPCIÓN

Vacuna conjugada de polisacárido neumocócico.

5 Antecedentes de la invención

Las bacterias patógenas clasificadas como *Streptococcus pneumoniae* (pneumococci, Pn) se han subdividido en 84 serotipos antigénicos en base al polisacárido capsular (Pn-Ps) del organismo. Los estados de enfermedad atribuibles a estos organismos incluyen neumonía, meningitis, otitis media, bacteremia y exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, sinusitis, artritis y conjuntivitis. Sin embargo, el predominio de estas enfermedades está causado por un subgrupo limitado de los 84 aislados conocidos. Así, una vacuna polivalente que contenga Pn-Ps de los aislados más predominantes y patógenos del organismo puede proporcionar protección frente a un porcentaje muy elevado de los patógenos descritos con más frecuencia de esta clase.

Se han producido vacunas polivalentes que son eficaces para desarrollar respuestas protectoras inmunitarias frente a neumococos en adultos. "PNEUMOVAX® 23" (Pneumococcal Vaccine Polyvalent, MSD, véase PDR, ed. de 1990, pág. 1431), por ejemplo, es una composición líquida que contiene 50 µg/ml de cada uno de los 23 polisacáridos neumocócicos no conjugados diferentes, todos los cuales están depositados en la ATCC y proporcionan una fuente posible de material de partida para la presente invención. "PNEUMOVAX® 23" comprende cada uno de los siguientes polisacáridos libres, es decir, no conjugados: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F, que constituyen aproximadamente el 90% de los aislados neumocócicos sanguíneos. Sin embargo, tales vacunas son menos eficaces en el segmento de la población con mayor riesgo de infecciones neumocócicas: individuos con células B inmunocomprometidas, la población anciana y los lactantes de menos de 2 años que dependen de las respuestas de las células T para la protección inmunitaria. Dado que los polisacáridos no conjugados son malos inductores de respuestas inmunitarias de las células T, la conversión de Pn-Ps en inmunógenos capaces de inducir respuestas de células T es la clave para la producción de protección adecuada en esta población diana. El uso sin embargo, no queda limitado a este grupo de individuos. Por ejemplo, la administración de una vacuna, que comprende uno o más de los nuevos conjugados, a un mamífero hembra antes de, o durante el embarazo produce anticuerpos en la madre que pueden proteger de forma pasiva un feto en desarrollo y los lactantes aunque la vacuna no se haya administrado directamente al feto o al lactante. Tales vacunas de conjugados también han demostrado utilidad para la obtención de anticuerpos para la protección pasiva final en poblaciones de riesgo, tales como recién nacidos o hermanos de individuos infectados.

Los polisacáridos que se han encontrado poco inmunogénicos por sí mismos han demostrado ser bastante buenos inmunógenos una vez que se han conjugado con una proteína inmunogénica, PRO [Marburg *et al.*, patente U.S. n° 4.695.624; Schneerson *et al.*, *New Dev. with Hum. & Vet. Vaccines*, 77,94 (1980); Schneerson, *et al.*, *J. Exptl. Med.*, 152, 361 (1980); Anderson, *Infection and Immunity*, 39, 233 (1983)]. Sin embargo, un problema fundamental en la producción de tales conjugados es la naturaleza viscosa y no homogénea del polisacárido material de partida y, por tanto, la dificultad para definir químicamente el producto conjugado. Así, se requiere un procedimiento en el que los materiales de partida estén tan bien definidos como sea posible y en cada etapa de la ruta sintética pueda ensayarse el intermedio formado. El procedimiento descrito en la presente satisface este requisito proporcionando inmunógenos conjugados altamente inmunogénicos contra los patógenos afines de los cuales se deriva Pn-Ps. Los conjugados son útiles en lactantes menores de dos años.

Marburg *et al.*, [*J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5282 (1986), y las patentes U.S. 4.695.624; 4.830.852; 4.882.317] divulgan un medio para conjugar polisacáridos y proteínas inmunogénicas mediante espaciadores bigenéricos. La PRO se derivatizó para portar grupos nucleófilos o electrófilos pendientes (PRO*), mientras que se funcionalizó un Ps complementario de modo que portara grupos pendientes de reactividad opuesta (Ps*). Al combinar Ps* con PRO*, se formaron espaciadores bigenéricos, uniendo por enlaces covalentes Ps a PRO (Ps-PRO). Tras la hidrólisis ácida, el espaciador bigenérico se libera en forma de aminoácido no usual, cuantificado por análisis de aminoácidos, y proporcionando así un medio para demostrar la covalencia.

El documento EP-A-097407 divulga vacunas contra las bacterias patógenas con polisacáridos capsulares y un procedimiento para su preparación.

El documento EP-A-208375 divulga conjugados glucoprotéicos que poseen actividad inmunogénica trivalente usados como vacunas.

El documento WO-A-8706267 divulga antígenos que poseen determinantes inmunogénicos de bacterias *Streptococcus* Grupo B y vacunas contra tales bacterias.

Aunque las tres referencias anteriores divulgan técnicas para la hidrólisis parcial y fraccionamiento conforme al tamaño y pureza de los antígenos de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, estas no divulgan ni sugieren en ninguna parte el procedimiento mejorado proporcionado por la presente invención.

La presente invención divulga un procedimiento mejorado respecto al que se divulga en las patentes U.S. 4.695.624, 4.830.852, 4.882.317. La mejoras incluyen la preparación de material de partida Pn-Ps que posee propiedades físicas más específicas, reproducibles y manejables que las proporcionadas por las preparaciones de Pn-Ps brutas, incluyen-

do: mayor solubilidad, mayor capacidad de filtrado, mayor pureza (reducción en la contaminación con polisacáridos C específicos para un grupo (C-Ps) y menor peso molecular, polidispersión y viscosidad. Los conjugados resultantes descritos en la presente están mejorados respecto a los proporcionados por el procedimiento del documento 4.695.624 con respecto a aumentos en la consistencia y facilidad de preparación, antigenicidad mejorada y pureza mejorada del producto final. Especialmente significativa es la reducción de 3 a 20 veces del polisacárido C específico a un grupo y contaminación por peptidoglucano en la preconjugación de Pn-Ps respecto a las preparaciones de Ps previas a la conjugación de la patente 4.695.624. Aunque la presencia del contaminante polisacárido C no interfiere en las respuestas inmunitarias frente a antígenos específicos a un tipo, el C-Ps podría participar en la reacción de conjugación haciéndola menos específica y controlada por el Ps específico a un tipo. Además, la producción de anticuerpos anti-polisacárido C puede relacionarse con la destrucción de tejido observada en algunas infecciones neumocócicas sin resolver.

Además del nuevo producto conjugado, la presente invención divulga un nuevo procedimiento para la preparación de intermedios de polisacárido neumocócico de elevada pureza y parcialmente hidrolizado, nuevas composiciones que comprenden de uno a diez conjugados diferentes y procedimientos de uso de la invención. Son de particular interés los polisacáridos capsulares incluidos en "PNEUMOVAX® 23" (Pneumococcal Vaccine Polyvalent, MSD, véase PDR, ed. de 1990, pág. 1431). Un subgrupo más preferido son los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, subtipos 6B, 23F, 19F, 14, 18C, 4 y 9V, ya que se estima que este pequeño grupo de subtipos neumocócicos es responsable del 75 al 85% de las infecciones neumocócicas en lactantes y niños. Los procedimientos proporcionados en la presente pueden aplicarse a un amplio grupo de polisacáridos neumocócicos y de otras bacterias.

Resumen de la invención

Se preparan polisacáridos neumocócicos (Pn-Ps) muy definidos químicamente mediante hidrólisis parcial de una preparación de Pn-Ps bruta hasta un punto final predeterminado para mantener la actividad antigénica del Pn-Ps. El Pn-Ps parcialmente hidrolizado se purifica sustancialmente y es útil para la preparación de conjugados (Pn-Ps-PRO) de proteína inmunogénica (PRO) y Pn-Ps.

Los conjugados Pn-Ps-PRO nuevos y muy antigénicos de la invención, que comprenden el complejo de la proteína de membrana externa (OMPC) o *Neisseria meningitidis* b, o las subunidades recombinantes o purificadas de la misma, como MIEP, u otras proteínas portadoras inmunogénicas unidas covalentemente a intermedios Pn-Ps parcialmente hidrolizados y muy purificados a partir de aislados neumocócicos comunes, son de utilidad para la prevención de infecciones neumocócicas en mamíferos. Los conjugados son particularmente útiles en composiciones de vacuna para la estimulación de respuestas inmunitarias antineumocócicas en mamíferos, en especial individuos con las células B inmunocomprometidas, los ancianos y en lactantes humanos menores de 2 años, ya que los conjugados obtienen respuestas de las células T. Los conjugados Pn-Ps-OMPC y Pn-Ps-MIEP se preparan mediante un procedimiento que comprende las etapas de: aislar el Ps capsular de cultivos de *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococos*, Pn), hidrolizar parcialmente o cortar físicamente el Pn-Ps, fraccionar dicho Pn-Ps, proporcionando un Pn-Ps producto de tamaño molecular, polidispersión y viscosidad reducidos y, a continuación conjugar covalentemente el Pn-Ps con OMPC o MIEP.

Objetos de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos polisacáridos capsulares (Pn-Ps) neumocócicos específicos para un tipo, parcialmente hidrolizados y muy purificados antigénicamente, útiles como intermedios en la preparación de conjugados dependientes de las células T de Pn-Ps y proteínas inmunogénicas. Otro objeto es proporcionar conjugados dependientes de las células T de Pn-Ps y proteínas inmunogénicas, útiles en composiciones de vacuna para evitar infecciones neumocócicas, en especial en lactantes menores de dos años y en personas con las células B inmunocomprometidas. Otro objeto es proporcionar un procedimiento, mejorado respecto al proporcionado en la patente U.S. n° 4.695.624, para la formación de conjugados covalentes de polisacárido neumocócico-proteína inmunogénica (Pn-Ps-PRO), en el que la mejora consiste en una mayor definición química y pureza del Pn-Ps de partida, intermedios, producto final y mayor consistencia y facilidad para llevar a cabo el propio procedimiento. Otro objeto es proporcionar conjugados Pn-Ps-PRO químicamente definidos, según el procedimiento mejorado, demostrando la dependencia de las células T, útiles para la obtención de anticuerpos séricos protectores frente a neumococos patógenos, en especial en lactantes menores de 2 años y en individuos inmunocomprometidos. Otro objeto es proporcionar un procedimiento de tratamiento, empleando estos conjugados en cantidades inmunológicamente eficaces en formulaciones de vacuna, para evitar enfermedades inducidas por neumococos tales como otitis media, meningitis, neumonía, bacteremia y las exacerbaciones agudas de artritis crónica, sinusitis, bronquitis y conjuntivitis.

Descripción detallada de la invención

A. Los Nuevos Conjugados Pn-Ps-PRO e Intermedios Polisacáridos

El producto conjugado Pn-Ps-PRO de la presente invención posee una relación Pn-Ps a PRO que varía de 0,05 a 0,5 mg de polisacárido/mg de proteína, un alto grado de covalencia, mínima contaminación del conjugado por el Pn-Ps libre y características físicas y químicas únicas aportadas por los nuevos polisacáridos constituyentes.

El conjugado comprende una proteína inmunogénica (PRO) unida covalentemente a través de un espaciador a un polisacárido capsular neumocócico (Pn-Ps) nuevo, parcialmente hidrolizado y muy purificado. La proteína inmunogénica es, con preferencia, el complejo de la proteína de membrana externa (OMPC) derivado de un cultivo de *Neisseria*

meningitidis b. Un procedimiento para preparar OMPC es esencialmente el proporcionado en la patente U.S. 4.271.147 y Ejemplo 1. Como alternativa, también se prefiere una subunidad de OMPC, como MIEP, producida por disociación del OMPC o por expresión recombinante del mismo. Un procedimiento para alcanzar este objetivo se proporciona en la solicitud de patente USSN 555.978; 555.329 y 555.204 (que corresponde al documento EP-A-0467714) y Ejemplo 2, 16-23.

El nuevo polisacárido capsular neumocócico (Pn-Ps) parcialmente hidrolizado y muy purificado es una preparación de un polisacárido antigénico derivado de un cultivo de uno de los subtipos neumocócicos (como se divulga más adelante en la sección que divulga un nuevo procedimiento de conjugación y en los Ejemplos 3-10). El Pn-Ps posee un peso molecular medio entre aproximadamente 1×10^5 y 1×10^6 daltons, como promedio menor de aproximadamente 1.000 unidades repetitivas por molécula, un nivel de contaminación de polisacárido C inferior a aproximadamente el 3% y un índice de antigenicidad de 0,4 a 1,1, y preferiblemente de 0,7 a 1,1. Este último parámetro es la cantidad relativa de uniones de anticuerpos antineumocócicos específicos a un tipo mostrada por unidad de masa del nuevo Pn-Ps, comparada con la de Pn-Ps bruto depositado en la ATCC. Además, el nuevo Pn-Ps es susceptible de conjugación con la proteína inmunogénica para producir el Pn-Ps-PRO producto de la invención. Algunas características físicas y químicas de dos preparaciones diferentes de Pn6B-Ps y dos preparaciones diferentes de Pn23F-Ps se citan en la Tabla I más adelante, mientras que la siguiente descripción divulga cómo se han medido dichas características. El procedimiento descrito a continuación proporciona un procedimiento para la preparación de intermedios Pn-Ps y conjugados Pn-Ps-PRO con una amplia gama de subtipos neumocócicos, incluyendo pero sin quedar limitados a aquellos seleccionados de los subtipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F. Como se ha citado anteriormente, un subgrupo preferido de polisacáridos neumocócicos son aquellos derivados de los subtipos neumocócicos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Es evidente para los expertos en la técnica que además de, o en lugar de, cualquiera de estos polisacáridos, pueden sustituirse otros en función de las necesidades derivadas en la población de riesgo. Así, Pn1-Ps y Pn5-Ps pueden tratarse de igual forma que Pn4-Ps o Pn9V-Ps, como se haría con los polisacáridos de *Neisseria meningitidis* B, C o estreptocócicos del Grupo B, mientras que Pn7F-Ps pueden tratarse como Pn14-Ps, como se desvelará con más detalle más adelante, e incluirse en una vacuna multivalente. También es evidente para los expertos en la técnica que mediante la inclusión de Pn6B-Ps, podría proporcionarse protección frente a Pn6A mediante anticuerpos reactivos cruzados. Esto también es cierto para una serie de subtipos neumocócicos diferentes.

Las vacunas multivalentes son aquellas que comprenden mezclas de diferentes conjugados de Pn-Ps-PRO, preparados cada uno por separado con un subtipo de Pn-Ps determinado. Además, las vacunas multivalentes son aquellas en las que varios subtipos de Pn-Ps diferentes se conjugan todos con una PRO determinada a la vez o de forma secuencial.

1. Caracterización de los Nuevos Intermedios Polisacáridos

Las características físicas y químicas de los intermedios polisacáridos capsulares neumocócicos purificados y parcialmente hidrolizados dependen del subtipo neumocócico del que se haya derivado y las manipulaciones que deberán sufrir conforme al procedimiento descrito en la presente. En general, los intermedios Pn-Ps tienen un tamaño molecular y una polidispersión de 2 a 10 veces inferior cuando se comparan con el polisacárido derivado de cultivo bacteriano bruto. El tamaño reducido permite una manipulación del polisacárido mejorada durante la conjugación y la eliminación de Pn-Ps libre después de la conjugación, mayor pureza de Pn-Ps/homogeneidad, menor tamaño molecular y polidispersión del Pn-Ps y una antigenicidad esencialmente inalterada. Estas nuevas características del Pn-Ps contribuyen de forma significativa a la formación consistente de un producto Pn-Ps-PRO antigénico altamente definido y altamente específico a un tipo.

i. Peso molecular y polidispersión del Pn-Ps

Midiendo el peso molecular medio ponderado M_w , por una técnica de difusión, sedimentación o cromatográfica y el peso molecular medio numérico, M_N , por una propiedad coligativa como la viscosidad, disminución del punto de congelación o elevación del punto de ebullición, se obtiene la polidispersión de la preparación de Pn-Ps como relación M_w/M_N . Cuando más se acerque este número a la unidad, más homogénea es la preparación de polisacárido. La polidispersión de una serie de preparaciones de Pn-Ps se enumera en la presente y se divulga también un procedimiento para obtener esta homogeneidad mejorada.

El coeficiente de reparto,

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i - V_o}$$

en la que:

V_o = volumen de huecos de la columna

V_i = volumen de permeación total

V_e = volumen de elución de la muestra

K_d = coeficiente de reparto de la muestra

- 5 de cada preparación de Pn-Ps bruta y parcialmente hidrolizada se mide mediante cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), o cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HPSEC), de una alícuota del polisacárido, conforme a procedimientos conocidos en la técnica. El K_d así obtenido es una medida del volumen hidrodinámico medio de la preparación de polisacárido. Dado que el tamaño molecular del Pn-Ps se reduce por cizallamiento físico o por hidrólisis térmica o sónica de acuerdo con el procedimiento descrito, el volumen de elución, V_e , del Pn-Ps aumenta
10 y también lo hace K_d .

- Una matriz de columna preferida para estos propósitos es el gel SEPHAROSE CL2B (Farmacia N° 17-0120-01). El volumen de huecos en la columna (V_o) se determina con Blue Dextran 2000 (Farmacia N° 17-0360-01) y el volumen de permeación total (V_i) a partir del pico de la sal cloruro sódico. De acuerdo con un procedimiento, la
15 muestra de Pn-Ps se prepara a 2,5 mg/ml en agua destilada y se usa un volumen de inyección de 1 ml. La relación V_o/V_i deberá encontrarse en el intervalo de 0,32-0,37. El K_d para Dextran T500 (Farmacia N° 17-0320-01) deberá encontrarse entre 0,37-0,49. Un sistema HPSEC preferido incluye una columna de 7,5 x 600 mm TSK G6000 PW calentada a 50°C.

- 20 En un procedimiento muy preferido, se combina SEC o HPSEC con un refractómetro diferencial, que controla la concentración de analito relativa como función del volumen de elución y un viscosímetro diferencial, que controla la viscosidad específica del analito como función del volumen de elución. A partir del análisis de una serie de patrones de poli(óxido de etileno) monodisperso se construye una curva de calibración universal [$\log(\text{viscosidad intrínseca por peso molecular})$ frente al volumen de retención]. Los perfiles de concentración y viscosidad específica se pueden usar
25 para calcular un perfil de peso molecular frente a volumen de elución para la muestra, que a su vez se usa para calcular los valores de M_n y M_w , a partir de los cuales se calcula el índice de polidispersión (M_w/M_n) [Yau, W.W. and Rementer, S.W., *J. Liq. Chromatog.*, 13, 627-675 (1990); Nagy, *J. Liq. Chrom.*, 13, 677-691 (1990); Benoit, *et al.*, *J. Ch. Phys. Tome.*, 63, 1507-1514 (1966)]. En la presente invención, se midió la viscosidad intrínseca en tampón fosfato sódico 0,1M a pH 7,2.

- 30 Una vez se ha determinado el peso molecular promedio de la preparación de Pn-Ps, se puede determinar fácilmente el número promedio de unidades repetitivas por molécula dividiendo el peso molecular del polímero por el peso molecular de la unidad repetitiva (véase la Tabla II).

35 ii. Retención de la antigenicidad específica de Pn-Ps

- Es importante, para cada Pn-Ps bruto sometido a cizallamiento físico o a hidrólisis térmica, química, sónica o enzimática, que se establezca el punto final en el que la integridad antigénica comienza a disiparse. Este punto final se establece convenientemente correlacionando la viscosidad con cualquiera de una serie de ensayos inmunológicos conocidos en la técnica. En un procedimiento preferido, se mide una alícuota de la solución de polisacárido mediante
40 el ensayo de doble inmunodifusión de Ouchterlony usando anticuerpos específicos a un subtipo de antígenos neu-mocócicos. La aparición de una banda de precipitina blanca en el agar que se une a la banda de precipitina de una muestra de Pn-Ps bruto colocado en un pocillo adyacente después de un período de difusión, proporciona identidad cualitativa de los reactivos y la evidencia de que la integridad antigénica del polisacárido permanece intacta. Un ensayo
45 inmunológico más cuantitativo se consigue por análisis de nefelometría diferencial o un RIA.

- La nefelometría diferencial mide el cambio o la velocidad de cambio en la intensidad de la luz difusa durante la formación de complejos antígeno-anticuerpo. La reacción se ejecuta en una célula de reacción a través de la cual se hace pasar un haz luminoso. En el presente caso, los complejos se forman por una reacción de inmunoprecipitina
50 que se produce en solución cuando un anticuerpo específico (Ab) reacciona con su antígeno específico (Ag), es decir, Pn-Ps. Debido a que la formación de un complejo Ag-Ab depende de la presencia de las moléculas de Ag y Ab en proporciones óptimas, el grado de formación del complejo para una cantidad constante de Ab aumenta con la cantidad de Ag hasta un nivel máximo; mayores cantidades de Ag originan la formación de menos complejo. Así, manteniendo un nivel constante de Ab y midiendo la luz difusa con concentraciones crecientes de Ag, se genera
55 una curva patrón. Es posible calcular la concentración de Ag para una preparación de Ps (o Ps derivatizado) cuando se hacen reaccionar muestras con sus Ab específicos bajo las mismas condiciones usadas para desarrollar la curva patrón.

- Una comparación de la concentración calculada inmunológicamente por nefelometría diferencial con la concentración obtenida por medios químicos o físicos (por colorimetría, índice de refracción o por hidrólisis total y cuantificación de monosacáridos - véase más adelante) proporciona un índice de antigenicidad para las muestras de Ps. El análisis del peso seco de los polisacáridos únicamente es apropiado si se conoce el contenido volátil de la preparación de polvo. Los polisacáridos son notablemente higroscópicos y pueden contener desde el 5 al 30% en peso de volátiles. Como tales, las medidas de peso seco en, y de los mismos no son particularmente fiables. Un procedimiento
60 usado para determinar la concentración de polisacárido con una exactitud razonable es por ensayo colorimétrico, en el cual el ensayo se calibra con una solución patrón del polisacárido de interés. Por ejemplo, Pn6B-Ps, Pn18C-Ps, Pn19F-Ps y Pn23F-Ps pueden cuantificarse todos por el ensayo de metil pentosa de Dische y Shettles [*J. Biol. Chem.*, 175, 595-603 (1948)]. Pueden cuantificarse Pn4-Ps, Pn9V-Ps, Pn14-Ps y Pn19F-Ps por el contenido en hexosamina

y también puede cuantificarse Pn9V por el contenido en ácido urónico. El ensayo de fenol-ácido sulfúrico [Dubois *et al.*, *Anal. Chem.*, 28, 350-365 (1956)] es útil para cuantificar todas estas preparaciones de Pn-Ps como parte de un ensayo durante el proceso durante la preparación del conjugado. El otro procedimiento empleado es usar una señal del índice de refracción como medida de la masa de analito, también calibrada con una solución patrón del polisacárido de interés. Aunque el ensayo colorimétrico se usa para controlar el contenido en polisacárido de las muestras durante el procedimiento de derivatización y conjugación, el procedimiento último se usa durante la caracterización física de la preparación de polisacárido por análisis de calibración universal HPSEC y para el cálculo del índice de antigenicidad. Al Pn-Ps bruto de partida se le asigna un valor del índice de antigenicidad de 1,0. Se calcula un índice de antigenicidad relativa para muestras experimentales y se considera como satisfactorio un valor de 0,4 a 1,1. Es posible obtener un índice de antigenicidad mayor de 1,0 si el polisacárido está purificado significativamente durante la etapa de hidrólisis y fraccionamiento. También es teóricamente posible que la reducción de tamaño sólo pueda incrementar el índice de antigenicidad de una preparación aumentando la flexibilidad de las moléculas de polisacárido y disminuyendo así el impedimento estérico alrededor de los epítomos antigénicos. Estas determinaciones se realizan como comprobación durante el proceso de muestras de Ps hidrolizadas, fraccionadas y derivatizadas. Las muestras que tienen antigenicidades relativas < 0,4 se rechazan, es decir, no se conjugan. Existen preparaciones de anticuerpo anti-Pn-Ps disponibles que son útiles para caracterizar polisacáridos neumocócicos. Los suministradores de anticuerpos anti-Pn-Ps incluyen el Health Research, Inc., Albany, NY, y el Staten Serun Institute. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti-Pn-Ps específicos a un tipo de antígeno para este propósito de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica que usan Pn-Ps bruto disponible comercialmente como inmunógeno [Baker *et al.*, *Immunology* 20, 469 (1971); Brooke M. S., *J. Immunol.*, 95, 358 (1966); Kearney, R. and Halladay, W. J., *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 48, 227 (1970); Schneerson, R. *et al.*, *Prog. Allergy*, 33, 144 (1983); Robbins, J. B., *Infect. Immun.*, 26, 1116 (1979).

Un indicador adicional de la integridad antigénica retenida es el mantenimiento de la composición química correcta de la preparación de Pn-Ps. Por ejemplo, Pn6B-Ps tiene una unidad repetitiva de [α -Gal(1-3)- α -Glu(1-3)- α -L-Rhap(1-4)-D-Ribitol-5-PO₄(2)] por lo que la relación de componentes carbohidratos ribitol:ramnosa:galactosa:glucosa es de aproximadamente 1:1:1:1. Esta relación puede determinarse, por ejemplo, tras la hidrólisis del polisacárido con ácido fluorhídrico al 36% durante aproximadamente 2 horas a 45-65°C, seguido por ácido trifluoroacético 2M durante 10-20 horas a 100°C y cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperimétrica de impulsos. Cuatro picos, que representan cantidades molares aproximadamente iguales de los componentes carbohidrato, es un indicativo de que se ha mantenido la integridad. Relaciones esencialmente teóricas de componentes carbohidrato se mantienen para todos los nuevos compuestos de Pn-Ps de la presente invención, aproximadamente en un 20%. Las desviaciones de los valores teóricos se deben fundamentalmente a limitaciones en la técnica del procedimiento. Así, tras la hidrólisis total:

Pn23F-Ps tiene una relación de glicerol:ramnosa:galactosa:glucosa de aproximadamente = 1:2:1:1;

Pn14-Ps tiene una relación de N-acetil-glucosamina:galactosa: glucosa de aproximadamente = 1:2:1;

Pn19F-Ps tiene una relación de ramnosa:N-acetil-mannosamina:glucosa de aproximadamente = 1:1:1;

Pn18C-Ps tiene una relación de glucosa:galactosa:ramnosa:glicerol:acetato de aproximadamente = 3:1:1:1:1;

Pn9V-Ps tiene una relación de glucosa:galactosa:N-acetil-mannosamina:ácido glucurónico:ácido galactúronico:acetato de aproximadamente = 2:1:1:1:1:7; y

Pn4-Ps tiene una relación de N-acetil-mannosamina:N-acetil-fucosamina:galactosamina:galactosa:piruvato de aproximadamente = 1:1:1:1:1. Además, recientemente se ha descubierto que Pn4-Ps contiene un componente adicional, identificado por análisis de HPLC, que parece ser 2-aminopneumosamina (2-amino-2,6-didesoxitalosa), como Pn5-Ps [Barker *et al.*, *Carbohydrate Res.*, 224-233 (1966)]. Pn19F-Ps también tiene un componente adicional, posiblemente una hexosamina, que no se ha descrito en la bibliografía, y cuya identificación definitiva está todavía pendiente. Estas y otras composiciones de polisacáridos repetidos teóricas adicionales se divulgan en las siguientes referencias bibliográficas: J.E.G. van Dam *et al.*, *Carbohydr. Res.* 187, 267 (1988); H. J. Jennings, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 41, 155 (1983) y las referencias incluidas en la misma; J. C. Richards and M. Perry, *Biochem. Cell. Biol.* 66, 758 (1988). Además de los componentes carbohidratos, existen grupos laterales fosfato, acetato y piruvato en algunos de los Pn-Ps de interés, teniendo algunos de estos características inmunodominantes. Como tales, estos componentes pueden controlarse también (véase el Ejemplo 30). La cuantificación de monosacáridos también es un medio útil para la cuantificación de la concentración de polisacáridos de la muestra.

Un elemento adicional en la antigenicidad de los polisacáridos objeto es el mantenimiento de lo que se ha denominado "un epítipo conformacional" en el polisacárido [véase por ejemplo Wessels, M.R. and Kasper, D.L., *J. Exp. Med.*, 169, 2121-2131 (1989)]. Este nivel de antigenicidad parece expresarse únicamente en las formas de peso molecular elevado del sacárido, y los procedimientos descritos en la presente también están dirigidos a la conservación de este nivel de inmunogenicidad del polisacárido.

iii. Contaminación mínima por polisacárido C

Otro parámetro crítico es el nivel de contaminación de polisacárido C. Este valor puede mostrarse por la hidrólisis ácida total de una preparación de polisacárido, cromatografía del hidrolizado y detección conductimétrica de colina [Hermans, *et al.*, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 107, 600 (1988)]. Como alternativa, el polisacárido no hidrolizado puede analizarse por RMN para colina. La técnica de RMN usa la relación entre la señal de colina y la señal de metilo de ramnosa (para Pn-Ps que contienen una ramnosa; una señal diferente para otro Pn-Ps) para calcular el contenido en C-Ps. El procedimiento de cromatografía usa la relación entre la señal de colina y el contenido en polisacárido determinado por ensayo de conductimetría o uno de los picos del componente Pn-Ps para calcular el contenido en C-Ps. En ambos procedimientos, los patrones de concentraciones conocidas de colina permiten el cálculo directo del nivel de colina presente en una preparación de polisacárido usando la estructura de repetición teórica de C-Ps (Herman *et al.* [*supra*]), se determina la concentración de C-Ps en una preparación de polisacárido. Las concentraciones de polisacárido de muestras de Pn-Ps se miden de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse la concentración de polisacárido total mediante hidrólisis total del polisacárido y medida de la concentración de un monosacárido específico. Comparando la concentración de C-Ps con la concentración de polisacárido total, se determina el grado de contaminación por polisacárido C (peso/peso). Se consideran aceptables niveles de polisacárido C inferiores al 3% (peso/peso) del polisacárido total, aunque son más preferibles niveles inferiores al 1%.

A continuación, en la Tabla I se resumen las propiedades químicas y físicas de dos lotes de Pn6B-Ps y dos lotes de Pn23F-Ps. Estos datos muestran la reproductibilidad de los parámetros entre lotes resultantes del nuevo procedimiento descrito en la presente:

TABLA I

Características de Pn-Ps Hidrolizado y Fraccionado				
Preparación de Pn-Ps	6B-1	6B-2	23F-1	23F-2
Viscosidad en el punto final	1,094	1,147	1,350	1,376
Kd (HPSEC)	0,62	0,62	0,49	0,49
Kd (CL-2B)	0,64	0,60	0,41	N.D.
Monosacárido	S	S	S	S
Antigenicidad:				
Ouchterlony	S	S	S	S
Nefelosa	S	S	S	S
(Fenol:sulfúrico)	S	S	S	S
S: satisfactorio				

En la tabla II, a continuación, se muestran los parámetros químicos y físicos de varios polisacáridos neumocócicos brutos y de los nuevos compuestos hidrolizados y fraccionados (Hid + frac) correspondientes de la presente invención. Los números presentados se aproximan al error experimental y los límites de detección para los compuestos de polisacáridos complejos que se preparan.

ES 2 121 820 T5

TABLA II

Características físicas y químicas de compuestos de Pn-Ps brutos y de los nuevos compuestos hidrolizados y fraccionados

Subtipo de Pn-Ps	K _d máximo	Viscosidad Intrínseca	PM medio ponderado (M _W)	PM medio numérico (M _N)	Polidispersión (M _W /M _N)	Nº unid. repetitivas por molécula	C-Ps (%)
4 bruto	0,55±0,05	4,34±10%	4,2x10 ⁵ ±20%	3,3x10 ⁵ ±20%	1,2-1,6	> 600	> 3
4 hid+fra	0,69±0,05	1,0-3,0	1x10 ⁵ -5x10 ⁵	2x10 ⁵ -4x10 ⁵	1,0-1,4	< 600	< 3
6B bruto	0,40±0,05	2,67±10%	1,4x10 ⁶ ±20%	9x10 ⁵ ±20%	1,5-2,5	> 1000	> 3
6B hid+fra	0,60±0,05	1,0-2,0	3x10 ⁵ -7x10 ⁵	3x10 ⁵ -6x10 ⁵	1,0-1,4	< 1000	< 3
9V bruto	0,53±0,05	2,29±10%	1,1x10 ⁶ ±20%	9x10 ⁵ ±20%	1,2-2,5	> 800	> 3
9V hid+fra	0,65±0,05	1,0-2,0	3x10 ⁵ -7x10 ⁵	3x10 ⁵ -6x10 ⁵	1,0-1,4	< 800	< 3
14 bruto	0,50±0,05	1,69±10%	1,1x10 ⁶ ±20%	7x10 ⁵ ±20%	1,3-2,5	> 1200	> 3
14 hid+fra	0,60±0,05	0,6-1,6	4x10 ⁵ -1x10 ⁶	3x10 ⁵ -8x10 ⁵	1,0-1,4	< 1200	< 3
18C bruto	0,50±0,05	5,20±10%	8,7x10 ⁵ ±20%	6x10 ⁵ ±20%	1,4-2,5	> 700	> 3
18C hid+fra	0,65±0,05	1,5-3,0	2x10 ⁵ -6x10 ⁵	2x10 ⁵ -6x10 ⁵	1,0-1,4	< 700	< 3
19F bruto	0,44±0,05	2,95±10%	1,0x10 ⁶ ±20%	6x10 ⁵ ±20%	1,8-2,5	> 1000	> 3
19F hid+fra	0,65±0,05	1,0-2,0	2x10 ⁵ -6x10 ⁵	2x10 ⁵ -6x10 ⁵	1,0-1,4	< 1000	< 3
23F bruto	0,36±0,05	4,15±10%	2,2x10 ⁶ ±20%	1x10 ⁶ ±20%	2,0-3,0	> 1000	> 3
23F hid+fra	0,54±0,10	1,5-3,0	4x10 ⁵ -8x10 ⁵	2x10 ⁵ -6x10 ⁵	1,0-1,4	< 1000	< 3

2. Caracterización del nuevo conjugado Pn-Ps-PRO

i. Análisis de la identidad y cantidad de Pn-Ps

Es muy útil verificar la cantidad e integridad química de Pn-Ps en un conjugado final mediante una técnica independiente que asegure la antigenicidad (integridad) y calcular la relación Pn-Ps/PRO. Un procedimiento incluye la hidrólisis total usando TFA 2M a 100°C durante 5-16 horas, dependiendo del tiempo de hidrólisis óptimo para cada Pn-Ps particular. Se analizan cantidades iguales de conjugado Pn-Ps-PRO y de hidrolizado PRO (en base a la proteína de Lowry) mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperimétrica de impulsos para obtener los perfiles de monosacárido. El perfil de PRO se “resta” del perfil del conjugado Pn-Ps-PRO usando un programa de ordenador apropiado como el programa Nelson, a fin de corregir los monosacáridos aportados por PRO, por ejemplo, de los lipopolisacáridos (LPS) presentes en OMPC. La cantidad de Pn-Ps en el conjugado se calcula entonces comparando el perfil de la cantidad conocida de hidrolizado Pn-Ps derivatizado y los conjugados Pn-Ps-PRO corregidos. La relación Pn-Ps/PRO se mide también de esta forma.

ii. Análisis de aminoácidos nuevos que indiquen conjugación y formación de un casquete

Tras la conjugación de Pn-Ps con PRO, se hidrolizan muestras de conjugado en HCl 6N y se someten a análisis de aminoácidos. Este procedimiento detecta la presencia y cantidad de aminoácidos únicos como S-carboximetil-homocisteína (S-CMHC) y S-carboximetil cisteamina (S-CMCA). El aminoácido anterior se crea como parte del enlace químico mediante la reacción química entre el Pn-Ps derivatizado y PRO como se divulga en la sección de procedimiento, más adelante, y se considera protector definitivo del enlace covalente del Pn-Ps derivatizado con PRO. La formación de dicho enlace covalente es esencial para la inmunogenicidad de las células T de la vacuna conjugada. Inmediatamente después de completarse la reacción de conjugación, los radicales bromoacetamida sin reaccionar forman un casquete con la N-acetil cisteamina. La hidrólisis de este enlace da como resultado la liberación de S-carboximetil cisteamina (S-CMCA), detectada también en el análisis de aminoácidos. La detección de este aminoácido confirma la formación del casquete con éxito de los grupos bromoacetamida reactivos, haciendo que los mismos no estén disponibles para cualquier reacción química no deseada. Los niveles aceptables de covalencia y formación de casquete se encuentran aproximadamente entre 1-15% para S-CMHC/Lys y aproximadamente 0-5% para S-CMCA/Lys.

iii. Análisis de la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio

En una realización preferida, el conjugado Pn-Ps-PRO se adsorbe en hidróxido de aluminio (gel de alúmina, Al(OH)₃) (véase la sección C, más adelante) dando como resultado una potenciación de la respuesta inmunitaria a la vacuna. Otra posible formulación de vacuna incluye la formulación en diluyentes fisiológicamente aceptables y el uso de otros coadyuvantes, inmunomoduladores o excipientes inertes distintos al gel de hidróxido de aluminio. El análisis de este material adsorbido en alúmina se proporciona a continuación.

El Pn-Ps-PRO adsorbido sobre alúmina se puede analizar para determinar la composición y estabilidad después de la desorción del conjugado de la alúmina. Esto se realiza por diálisis del Pn-Ps-PRO adsorbido sobre alúmina frente a solución de citrato sódico al 3% durante 16 horas a temperatura ambiente. La sal citrato de aluminio soluble resultante migra desde la membrana de diálisis y se queda detrás del Pn-Ps-PRO. Este procedimiento es importante a fin de confirmar que la cantidad correcta de Pn-Ps-PRO está en la formulación adsorbida sobre alúmina. Sin embargo, algunas formulaciones como Pn6B-Ps-OMPC y Pn23F-Ps-OMPC contienen 10, 5, 2 y 1 µg de Pn-Ps/ml (véase la sección C, más adelante), concentraciones bastante por debajo de los procedimientos de detección química. Por tanto, a fin de realizar análisis de composición de carbohidratos, las vacunas de Pn-Ps-OMPC adsorbido se sedimentan en primer lugar para eliminar el líquido acuoso y el sedimento se resuspende en un quinto del volumen original antes de disolver con citrato. Después de la diálisis, el Pn-Ps-OMPC solubilizado está presente a 50, 25, 10 y 5 µg de Pn-Ps/ml. Estas concentraciones son ahora manejables para el análisis de Pn-Ps y proteínas para confirmar los niveles de dosificación.

Las muestras desorbidas en citrato también se analizan para determinar la posible presencia de Pn-Ps libre, una cuestión que es importante para la inmunogenicidad y consistencia de la producción. Este análisis se realiza por cromatografía sobre una columna de clasificación volumétrica de SEPHAROSE CL-2B o SEPHACRYL S1000SF en la que se puede separar Pn-Ps-OMPC de Pn-Ps. La presencia y cantidad de Pn-Ps libre se mide desde el punto de vista antigénico por nefelometría diferencial. El nivel de contaminación de Pn-Ps-OPMC por Pn-Ps libre es menor del 15% del Pn-Ps total presente.

iv. Ensayo de pirógenos: Ausencia de Pirogenicidad significativa

El producto conjugado de la presente invención se ensaya para determinar la ausencia de efectos de elevación de temperatura adversos. Se han producido productos conjugados conforme al procedimiento descrito en la presente y se ha encontrado que tienen niveles aceptables de pirogenicidad.

Procedimiento (I.V.)

La vacuna conjugada de Pn-Ps se ensaya como se divulga en 21 CFR, Sección 610.13(b).

1) Procedimiento (I.M.)

5

10 v. *Naturaleza del enlace covalente*

15



35



45



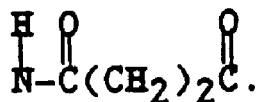
55



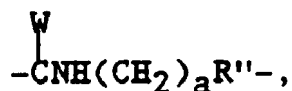
65



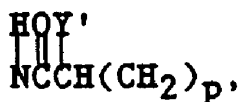
NR' o



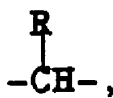
En el espaciador, A'-S-E'-B', S es azufre; A' es



en el que a es 1 a 4 y R'' es CH₂ o



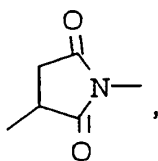
en el cual Y' es NH₂ o NHCOR' y W, p y R' son como se han definido anteriormente y E' es el producto de la transformación de un grupo tiófilo que se ha hecho reaccionar con un grupo tiol y se representa por



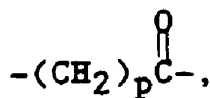
en el que R es como se ha definido anteriormente y B' es



o E' es



y B' es



en el que p es 1 a 3. Además, de los espaciadores bigenéricos, A-E-S-B y A'-S-E'-B', los componentes -E-S-B y A'-S-E' se pueden determinar y cuantificar, reflejando esta identificación la covalencia del enlace conjugado que une el lado del tioéterazufre que se origina del polisacárido modificado covalentemente con el lado del espaciador que se origina de la proteína funcionalizada.

Los conjugados Pn-Ps-A-E-S-B-PRO, conforme a la presente invención pueden contener espaciadores cuyos componentes incluyan derivados de, *inter alia*: dióxido de carbono, 1,4-butanodiamina y S-carboximetil-N-acetilhomocisteína; dióxido de carbono, 1,5-pentanodiamina y S-carboximetil-N-acetilhomocisteína; dióxido de carbono, 3-oxa-1,5-pentanodiamina y S-carboximetil-N-acetilhomocisteína; dióxido de carbono, 1,4-butanodiamina y S-carboximetil-N-acetil-cisteína; dióxido de carbono, 1,3-propanodiamina y S-carboximetil-N-benzoilhomocisteína; dióxido de carbono, 3-aza-1,5-pentanodiamina y S-carboxi-metil-N-acetilcisteína; dióxido de carbono, 1,2-etanodiamina, glicina y S-(succin-2-il)-N-acetilhomocisteína. Los conjugados Pn-Ps-A'-S-E'-B'-PRO, conforme a la presente invención, pueden contener espaciadores cuyos componentes incluyan derivados de, *inter alia*: dióxido de carbono y S-carboximetilcisteamina; dióxido de carbono y S-(α -carboxietil)cisteamina; dióxido de carbono y S-carboximetilhomocisteamina; dióxido de carbono, S-(succin-2-il)cisteamina y glicina; dióxido de carbono y S-carboximetilcisteína.

B. Procedimiento para preparar los nuevos intermedios de Pn-Ps y conjugados de Pn-Ps-PRO

En la descripción de este procedimiento, se divulgan varias etapas de forma diferenciada:

I. Preparación del polisacárido

- a) Aislamiento de polisacárido neumocócico bruto, Pn-Ps;
- b) Hidrólisis parcial o cizallamiento mecánico del Pn-Ps bruto;
- c) Fraccionamiento de Pn-Ps parcialmente hidrolizado según tamaño y pureza;

II. Conjugación

- a) Funcionalización del Pn-Ps fraccionado para formar el Pn-Ps* reactivo nucleófilo o electrófilo, preferiblemente para mostrar aproximadamente 21 grupos bromoacetilo reactivos por 100 unidades repetitivas de oligosacárido Pn-Ps;
- b) aislamiento de la Proteína Inmunogénica (PRO), preferiblemente el OMPC B de *Neisseria meningitidis* o una subunidad del mismo;
- c) Funcionalización de PRO para generar la PRO* reactiva nucleófila o electrófila, preferiblemente OMPC o una subunidad del mismo como MIEP para mostrar los radicales sulfhidrilo reactivos;
- d) Conjugación del polisacárido (Pn-Ps*) de la etapa (a) con la proteína (PRO*) de la etapa (c);
- e) Formación del casquete en el conjugado Pn-Ps-PRO para retirar los grupos funcionales residuales;
- f) Aislamiento del producto conjugado.

I.a) Aislamiento de polisacárido neumocócico bruto, Pn-Ps

Los polisacáridos capsulares neumocócicos se diferencian química y antigénicamente debido a la composición y enlace de la unidad repetitiva del oligopolisacárido del serotipo del polisacárido capsular dado. El aislamiento de los polisacáridos tiene que transcurrir por líneas algo diferentes dependiendo de las características físicas del polisacárido dado. Sin embargo, en general, las bacterias se cultivan y el Pn-Ps se recupera conforme a procedimientos conocidos [Ejemplo 3, y Williams, C.A., y Chase, M.W., *Methods in Immunology and Immunochemistry*, vol. I, Academic Press (1967)], mientras que los propios patógenos están disponibles de la ATCC. En resumen, después de un cultivo a gran escala de las bacterias en un medio nutriente apropiado conocido en la técnica para soportar el crecimiento de neumococos, se añade un bactericida, como fenol o tolueno, para matar los organismos (Ejemplo 3).

El fraccionamiento con alcohol del polisacárido se realiza entonces en dos etapas. En la primera etapa, se usa una concentración de alcohol reducida para precipitar los restos celulares y otras impurezas no deseadas, mientras que el Pn-Ps bruto permanece en solución. Una adición posterior de alcohol miscible en agua a una concentración predefinida precipita los polisacáridos capsulares, quedando las impurezas adicionales en el líquido sobrenadante. La resuspensión en un medio acuoso viene seguida por la eliminación de proteínas contaminantes y ácidos nucleicos por procedimientos conocidos como la digestión proteolítica o con nucleasas o la extracción en disolvente. El polisacárido bruto se recupera por precipitación en alcohol y secado, formando un polvo del Pn-Ps bruto (Ejemplo 3).

I.b) Hidrólisis parcial o cizallamiento mecánico del Pn-Ps bruto

El polisacárido bruto preparado fundamentalmente como se ha descrito anteriormente [véase también el Ejemplo 3, más adelante] se ha usado en un estado no conjugado para formular vacunas antineumocócicas destinadas para su uso en adultos y niños mayores de 2 años de edad. Las etapas del procedimiento que sigue proporcionan un Pn-Ps

producto nuevo, parcialmente hidrolizado y purificado que posee propiedades químicas y físicas únicas y definidas (véase la Tabla II) útil en la preparación de vacunas conjugadas. La reducción de tamaño del Pn-Ps bruto contribuye al éxito de las etapas de purificación posteriores para proporcionar un Pn-Ps producto altamente purificado. Además, cuando se usa para preparar conjugados, la conjugación es más eficaz cuando se usa el nuevo Pn-Ps de la presente invención. Esto se debe a que las soluciones acuosas del material polisacárido bruto son muy viscosas, poco solubles y sus conjugados son bastante insolubles y poco filtrables. El propio procedimiento de conjugación es difícil de realizar, proporcionando un bajo rendimiento de conjugado. Además, la eliminación del Pn-Ps no conjugado del conjugado final se ve facilitada cuando el Pn-Ps previo a la conjugación tiene tamaño y viscosidad reducidos y solubilidad mejorada. Esto es significativo, ya que la presencia de Pn-Ps libre en las preparaciones de conjugados hace difícil estimar la dosis real de Pn-Ps conjugado que se está administrando y, como es el Pn-Ps conjugado el que posee el efecto estimulador de las células T significativo, la presencia de Pn-Ps no conjugado representa una disminución de Pn-Ps inmunológicamente “relevante”.

El polisacárido capsular seco y bruto, tal como se ha preparado anteriormente, se puede purificar, por ejemplo, por cromatografía de intercambio aniónico u otro procedimiento cromatográfico, antes de, o después de la hidrólisis parcial, como se muestra en el Ejemplo 6 para Pn14-Ps. La adsorción-desorción cromatográfica se puede usar positiva o negativamente. En el modo positivo, se adsorbe Pn-Ps en la resina dejando las impurezas en solución, que se eliminan por lavado antes de la desorción del Pn-Ps. En el modo negativo, se adsorben las impurezas de la solución de Pn-Ps y se descartan, quedando el Pn-Ps en solución en estado purificado. Como alternativa, el Pn-Ps se puede someter directamente a hidrólisis térmica parcial, como se muestra en el Ejemplo 4 para Pn6B-Ps o por hidrólisis sónica como se muestra en el Ejemplo 6 para Pn14-Ps. También se conocen otros medios de hidrólisis, como químicos, enzimáticos o físicos (por ejemplo, un autoclave de alta presión).

La hidrólisis parcial se realiza mediante un tratamiento térmico limitado en un medio acuoso, preferiblemente de 50 a 110°C durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas. Como alternativa, se repite un tratamiento sónico limitado de alta energía, de 5 segundos a 5 minutos, con períodos de enfriamiento, tantas veces como sea necesario hasta alcanzar la viscosidad deseada o K_d final. El procedimiento de hidrólisis sónica se prefiere respecto al de hidrólisis térmica con polisacáridos que poseen estructuras complejas (véase más adelante). También son aplicables otros medios apropiados conocidos en la técnica para realizar la hidrólisis parcial de polisacáridos. Por ejemplo, se puede usar también hidrólisis química limitada con ácido, tratamiento enzimático endolítico o cizallamiento físico en un mezclador o molino para reducir el tamaño de cadena de Pn-Ps promedio.

En una realización preferida, el Pn-Ps se somete a cizallamiento físico haciéndolo pasar a través de un homogeneizador a una temperatura de aproximadamente 0°C a 30°C y presiones de 13,8 MPa a 103 MPa, predeterminados para proporcionar un Pn-Ps producto con características deseables en cuanto a tamaño, polidispersión y antigenicidad (véase el Ejemplo 10).

Un punto final de hidrólisis deseado, medido de forma conveniente por viscosidad en solución o cromatografía de exclusión molecular de alta resolución, se determina previamente para cada polisacárido en una escala piloto de modo que no se revoque la antigenicidad del polisacárido. Como se ha descrito anteriormente, se considera satisfactoria una capacidad nominal para unirse a anticuerpos antineumocócicos específicos que no sea inferior al 70% de la unión mostrada para una concentración igual del material de partida Pn-Ps bruto. No se puede afirmar que el Pn-Ps de M_n , M_w o número de unidades repetitivas por molécula (Tabla II) sustancialmente menores no pudieran generarse por el procedimiento y que dicho Pn-Ps, que puede no reaccionar por encima del límite del 70% establecido anteriormente para el ensayo de nefelometría diferencial, puede ser inmunógeno en animales tras la conjugación. Es decir, que a pesar de la ausencia de capacidad apreciable para unirse a anticuerpos anti-Pn-Ps específicos a un tipo de antígeno, el Pn-Ps de bajo peso molecular en estado conjugado puede ser reconocido por el sistema inmunitario de mamíferos y puede generarse una buena respuesta antineumocócica específica a un tipo de antígeno. En este caso, el término “antígeno” se deberá reemplazar por “inmunogénico” como criterio operativo para aceptar o rechazar una preparación de Pn-Ps dada. En la práctica, sin embargo, es más conveniente utilizar el parámetro de antigenicidad *in vitro* en lugar del parámetro de inmunogenicidad *in vivo* como control del proceso.

En general, es aplicable el mismo procedimiento de reducción de tamaño a la mayoría de polisacáridos. Sin embargo, mientras el Pn6B-Ps retiene su antigenicidad después de una reducción de tamaño térmica extensiva, el Pn23F-Ps puede perder la integridad estructural (eliminación de las cadenas laterales glicerol-fosfato) necesitando la reducción de tamaño más suave obtenible por medios sónicos o de cizalla física. El cizallamiento físico, por ejemplo, en un homogeneizador Gaulin, es un procedimiento preferido por varias razones. En primer lugar, el procedimiento es aplicable para el aumento de escala. En segundo lugar, los procedimientos de hidrólisis sónica y térmica requieren por lo general un fraccionamiento posterior del Pn-Ps hidrolizado para conseguir polidispersiones en el intervalo de 1,0 a 1,5. El procedimiento de cizallamiento físico, sin embargo, proporciona en general un Pn-Ps producto que posee una polidispersión que está en este intervalo sin fraccionar adicionalmente, aunque puede emplearse fraccionamiento para conseguir incrementos adicionales en la pureza y disminuir la contaminación de C-Ps si fuera necesario. En tercer lugar, el procedimiento de cizallamiento físico puede tener la virtud de una mayor reproducibilidad para cualquier Pn-Ps dado cuando se compara con los medios de hidrólisis térmica o sónica. En cuarto lugar, el procedimiento de cizallamiento físico parece proporcionar ciertas ventajas en la producción de Pn-Ps producto que retiene más antigenicidad para un tamaño dado que el Pn-Ps del mismo tamaño producido por hidrólisis sónica o térmica.

La viscosidad, que está relacionada con el peso molecular promedio del Pn-Ps, es un parámetro conveniente de controlar durante el curso del proceso y se sigue fácilmente durante la hidrólisis para limitar y controlar el grado de reducción de tamaño. Se han preparado lotes química y físicamente indistinguibles de Pn6B-Ps y Pn23F-Ps simplemente por reducción de tamaño del polisacárido hasta una viscosidad final deseada consistente (véase la Tabla I anterior).

Dicho uso de las medidas de viscosidad durante el proceso puede aplicarse a una amplia gama de polisacáridos brutos, permitiendo su reducción de tamaño por hidrólisis sin alterar las características de los Pn-Ps antigénicos resultantes. Como se ha descrito anteriormente, la retención de la antigenicidad se establece fácilmente, por ejemplo, por un ensayo de doble difusión de Ouchterlony, nefelometría diferencial u otros procedimientos conocidos en la técnica.

En la Tabla III se proporcionan las viscosidades finales deseadas para soluciones de 1 mg/ml de varias preparaciones de Pn-Ps en cloruro sódico (0,9%) (solución salina). Estos valores son igualmente aplicables a Pn-Ps derivados de otros subtipos neumocócicos:

TABLA III

Viscosidad en solución para Pn-Ps bruto e hidrolizado:		
Subtipo de Pn-Ps	Viscosidad de Pn-Ps bruto (centistokes)	Viscosidad final deseada (centistokes)
Pn4-Ps	1,8	1,5-1,00
Pn6B-Ps	1,4	1,3-1,00
Pn9V-Ps	1,4	1,3-1,00
Pn14-Ps	1,2	1,1-0,95
Pn18C-Ps	2,0	1,5-1,00
Pn19F-Ps	1,4	1,3-1,00
Pn23F-Ps	1,6	1,5-1,00

En el caso de algunos polisacáridos neumocócicos, es ventajoso incluir una etapa de purificación adicional como una etapa de intercambio iónico antes de, o después de la hidrólisis parcial. En el caso de Pn14-Ps, esta etapa se realiza por una adsorción discontinua por resina WHATMAN DE52 de impurezas aniónicas antes de la hidrólisis sónica parcial. El polisacárido que es neutro al pH ligeramente ácido del tratamiento se recupera como fracción sobrenadante de forma sencilla para la hidrólisis.

Los valores de peso molecular de preparaciones de Pn6B-Ps son de aproximadamente 900 kilodaltons (kD) antes, y de aproximadamente 300 kD después de la reducción de tamaño y fraccionamiento. Para Pn23F-Ps, los valores respectivos son de aproximadamente 1.000 kD o más antes, y de aproximadamente 400-500 kD después. Así, la reducción del tamaño de Pn-Ps hasta aproximadamente 500 ± aproximadamente 300 kilodaltons es un objetivo apropiado para esta fase del procedimiento para cada subtipo de Pn-Ps.

La reprecipitación del material parcialmente hidrolizado con concentraciones predeterminadas de alcohol permite recuperar y purificar adicionalmente el Pn-Ps parcialmente hidrolizado, como se divulga más adelante en la subsección (c).

I.c) Fraccionamiento del Pn-Ps parcialmente hidrolizado según el tamaño y pureza

La polidispersión de una preparación de Pn-Ps no solo es un indicador de la variación de la longitud de cadena del Pn-Ps específica del subtipo, sino que también es un indicador de que en la solución de Pn-Ps puede permanecer polisacárido C específico del grupo, así como otros contaminantes. Como se ha citado anteriormente, la contaminación por polisacárido C residual no es útil y puede incluso estar relacionada con respuestas inmunitarias adversas.

Convenientemente, se realiza la selección de un estrecho intervalo de tamaño molecular promedio del polisacárido (polidispersión reducida) mediante solubilización diferencial en alcohol, como etanol y preferiblemente isopropanol (IPA), después de la reducción de tamaño. La base de esta selección es que, para una preparación de Pn-Ps dada, la solubilidad en alcohol es inversamente proporcional a la longitud de la cadena, que a su vez es proporcional al peso molecular. Así, el procedimiento se ha aplicado con éxito para aislar cuantitativamente poblaciones de moléculas con tamaños consistentes con una homogeneidad significativamente mejorada respecto al Pn-Ps de tamaño reducido

inicial. El control durante el proceso de fraccionamientos en IPA se proporciona realizando un experimento piloto para predecir el intervalo de IPA en el cual precipita el Pn-Ps. Se emplea un ensayo de Nefelosa dirigido a anticuerpos para controlar el fraccionamiento y asegurar la recuperación cuantitativa del Pn-Ps. Con esta mejora, la contaminación por polisacárido C, el polisacárido específico del grupo común a muchos aislados neumocócicos diferentes, se reduce de aproximadamente 3 a 20 veces respecto al nivel encontrado en las preparaciones de Pn-Ps bruto. Además, la polidispersión de tamaño molecular de la preparación de Pn-Ps se reduce simultáneamente de 1,0 a 1,4.

Una técnica alternativa al fraccionamiento con IPA del Pn-Ps de tamaño reducido es la cromatografía del Pn-Ps de tamaño reducido acuoso a través de una resina de exclusión de tamaño apropiada, por ejemplo resina CL-2B u otra resina capaz de incluir y fraccionar el polisacárido en el intervalo de peso molecular de 200 a 1.000 kilodalton. En este sentido, es conveniente HPSEC usando una matriz de exclusión molecular rígida para reducir retrasos y aumentar la resolución. La selección de fracciones que eluyen de la columna con una viscosidad predeterminada o tiempo de retención predeterminado o mediante detección en línea proporciona una población de moléculas de Pn-Ps con las características deseables de tamaño, viscosidad y pureza descritas anteriormente.

La preparación de Pn-Ps que se toma a través de las etapas adicionales de fraccionamiento con IPA o por cromatografía funciona de forma más consistente durante las etapas de unión química y por tanto produce conjugados con características reproducibles. También se obtienen incrementos concomitantes significativos en la pureza del Pn-Ps, en particular, los niveles de C-Ps disminuyen enormemente.

Como resultado de las manipulaciones y medidas anteriormente descritas, las características preferidas de los intermedios de Pn-Ps son las resumidas en la Tabla II anterior.

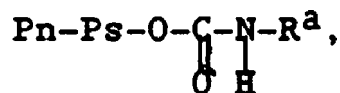
II.a) *Funcionalización del Pn-Ps fraccionado para formar el Pn-Ps* reactivo nucleófilo o electrófilo, preferiblemente para que muestre aproximadamente 10-40 grupos bromoacetilo reactivos por 100 unidades de Pn-Ps monómero*

El Pn-Ps de la Etapa I.(c) anterior es suficientemente homogéneo y posee propiedades, tales como solubilidad mejorada y viscosidad reducida, para producir el Pn-Ps susceptible de conjugación. Los expertos en la técnica tienen disponibles muchos esquemas diferentes para la preparación de conjugados de polisacáridos y otros radicales. El procedimiento descrito en la presente es solamente una ruta posible para utilizar el nuevo intermedio Pn-Ps parcialmente hidrolizado y fraccionado de la presente invención para formar conjugados y no se considerará como el modo exclusivo de uso del intermedio Pn-Ps.

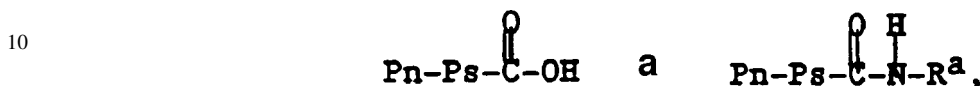
El procedimiento con espaciador bigenérico descrito por Marburg, S. *et al.*, [Patente U.S. 4.695.624; *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5282 (1986)] es un procedimiento preferido para conjugar el Pn-Ps fraccionado y de tamaño reducido con una proteína inmunogénica. El Pn-Ps se funcionaliza para que muestre grupos electrófilos o nucleófilos. El Pn-Ps* que se origina puede reaccionar entonces con una proteína funcionalizada inversamente, PRO*. El procedimiento de la presente invención también incluye la selección de un nucleófilo o bis-nucleófilo que reaccione con el polisacárido activado formando un polisacárido modificado de forma covalente con sitios electrófilos pendientes o grupos tiol pendientes, evitando así la necesidad de funcionalizar adicionalmente el polisacárido modificado con el bis-nucleófilo antes de hacer reaccionar el polisacárido modificado de forma covalente con la proteína modificada de forma covalente. Además, la funcionalización de la proteína con otro radical puede realizarse en más de una etapa conforme a la selección de reactivos en estas etapas.

Cualquiera que sea la funcionalidad deseada del Pn-Ps*, el Pn-Ps de tamaño reducido fraccionado deberá solubilizarse en primer lugar en un disolvente que no interfiera con el procedimiento de funcionalización. Dado que los grupos hidroxilo del Pn-Ps son los más susceptibles de funcionalización, la eliminación de agua del Pn-Ps para efectuar la funcionalización inicial es crítica. La sustitución de los hidrógenos ácidos de Pn-Ps con un catión hidrófobo como tetra- o tributilamonio convierte al Pn-Ps en soluble en disolventes no acuosos, como DMSO o DMF. Como es natural, no existe la necesidad de realizar esta sustitución en Pn-Ps que sea neutro (por ejemplo, Pn14-Ps o Pn7F-Ps). Una vez en solución no acuosa, el Pn-Ps se puede hacer reaccionar con un bis-electrófilo como carbonildiimidazol formando un imidazoildiuretano. El número de grupos funcionales por 100 unidades monómeras de Pn-Ps se controla en este punto por adición de una cantidad limitada de aproximadamente 1/5 del reactivo de carbonildiimidazol, comparado con los monómeros de Pn-Ps totales, en base molar, tal que en promedio sólo se derivatizan aproximadamente 10-40 de cada 100 unidades de monómero Pn-Ps. Esta especie es susceptible de sustitución nucleófila por reactivos como i) diclorhidrato de cistamina que permite la formación de derivados de Pn-Ps* nucleófilos, o ii) 1,4-butanodiamina que permite la formación de derivados Pn-Ps* electrófilos, como se divulga en la patente U.S. 4.695.624 y Marburg *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5282 (1986).

Recientemente se ha descubierto que, debido a que algunos polisacáridos neumocócicos ácidos, como Pn9V-Ps, Pn4-Ps, Pn1-Ps, Pn5-Ps y los polisacáridos B y C de *Neisseria meningitidis* muestran grupos ácido carboxílico libres, así como grupos hidroxilo libres, la química de conjugación de estos polisacáridos transcurre de una forma ligeramente distinta cuando se compara con los polisacáridos neutros o polisacáridos que son aniónicos a causa de la presencia de enlaces fosfodiéster, como en polirribosilribitolfosfato. En general, la química de conjugación de polisacáridos con carboxilato libre transcurre mediante la conversión de los hidroxilos del polisacárido libres en enlaces uretano, es decir, de Pn-Ps-OH a



5 en la que R^a representa el resto de cadena de átomos que une el polisacárido a la proteína. Sin embargo, en los polisacáridos que contienen ácidos carboxílicos, como Pn9V-Ps, que contiene glucoronato o Pn4-Ps que contiene grupos piruvato, la química transcurre de:



10 en la que R^a de nuevo representa el resto de la cadena de átomos que une el polisacárido a la proteína. Por lo tanto, lo que se observa es que el grupo funcional éster del uretano, o no se forma en el polisacárido que contiene el ácido carboxílico, o además se forma un enlace sencillo amida en estos sitios. La química de conjugación transcurre a una velocidad más elevada debido a la presencia de grupos funcionales ácido carboxílico.

15 Debido a que se cree que los grupos funcionales ácido carboxílico son importantes contribuyentes a la antigenicidad e inmunogenicidad de esta clase de polisacáridos aniónicos, la química de conjugación deberá controlarse cuidadosamente para estos polisacáridos. La necesidad de relaciones elevadas polisacárido a proteína en el conjugado final se deberá equilibrar frente a la necesidad de mantener la integridad antigénica. Este objetivo se consigue limitando la cantidad de activación inducida por carbonildiimidazol inicial. Una vez formada la amida, la siguiente etapa que implica diclorhidrato de cistamina o 1,4-butanodiamina puede transcurrir como se ha citado anteriormente y se divulga más adelante con más detalle.

20 Como alternativa, los grupos carboxilo pueden protegerse inversamente y desprotegerse seguidamente usando trimetilsililo, o grupos protectores similares que puedan retirarse posteriormente en condiciones alcalinas suaves, o usando ésteres de 2,4-dimetoxibencilo que sean lábiles a ácidos. En este caso, la química de conjugación puede transcurrir de la forma convencional a través de los grupos hidroxilo del polisacárido.

1. Producción de Pn-Ps* nucleófilo:

25 El Ps activado con carbonildiimidazol, de tamaño reducido y fraccionado obtenido anteriormente se puede hacer reaccionar, en disolventes acuosos o no, con reactivos como los descritos en la patente U.S. 4.695.624. Un reactivo preferido es diclorhidrato de cistamina. La eliminación posterior de la cistamina en exceso y la reducción con ditiotritol o ditiotritol proporcionan el Pn-Ps funcionalizado con sulfhidrilo nucleófilo. Este derivado Pn-Ps* puede reaccionar con una PRO* electrófila, por ejemplo, cuando la proteína se ha modificado para que presente grupos bromoacetilo pendientes.

40 2. Producción de Pn-Ps* electrófilo:

El Pn-Ps activado con carbonildiimidazol, de tamaño reducido y fraccionado obtenido anteriormente se puede hacer reaccionar, en disolventes acuosos o no, con reactivos como los descritos en la patente 4.695.624, preferiblemente con 1,4-butanodiamina (BuA₂). La posterior acilación del Pn-Ps-BuA₂ con bromoacetato de p-nitrofenilo o reactivo similar, genera el derivado Pn-Ps-BuA₂-BrAc electrófilo capaz de reaccionar con una PRO* nucleófila, como una proteína modificada con sulfhidrilo. El grado de derivatización se mide en este punto por RMN y comparación de la 1,4-butanodiamina integral con una señal de monosacárido conveniente como la del metilo de la ramnosa. Los grados preferidos de derivatización varían de 10 a 40% y, más preferiblemente de aproximadamente 20%.

50 II.b) Aislamiento de proteína inmunogénica (PRO), preferiblemente el OMPC B de *Neisseria meningitidis*, o una subunidad de la misma

55 El radical proteína deberá comportarse como un potenciador inmunitario. En la elección de la proteína, es deseable evitar aquellas que den lugar a activación no específica de la respuesta inmunitaria del huésped (reactogenicidad). En la patente U.S. 4.695.624, Marburg *et al.*, usaron el complejo de la proteína de membrana externa (OMPC) derivado de *Neisseria meningitidis* para preparar conjugados polisacárido-proteína. OMPC ha demostrado ser adecuado en la presente invención, aunque pueden usarse otras proteínas inmunógenas como el toxoide del tétanos o de la difteria o pertussis.

60 Se han ideado diferentes procedimientos para purificar OMPC a partir de las bacterias gram-negativas [Frasch *et al.*, *J. Exp. Med.*, 140, 87 (1974); Frascch *et al.*, *J. Exp. Med.*, 147, 629 (1978); Zollinger *et al.*, patente U.S. 4.707.543 (1987); Helting *et al.*, *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect C*, 89, 69 (1981); Helting *et al.*, patente U.S. 4.271.147]. La OMPC usada en la presente se preparó como se divulga en el Ejemplo 1. Además, también se prefiere una subunidad de la proteína aislada por disociación de OMPC o por expresión recombinante del material que codifica para una proteína constituyente de OMPC, en particular la proteína de membrana principal (también denominada proteína de inducción mitogénica, MIP o proteína potenciadora inmunitaria principal, MIEP). En el Ejemplo 2, 16-23 y en las solicitudes de

patente U.S. USSN 555.978; 555.329; 555.204; y 639.457 (correspondiente al documento EP-A-0467714) se divulga un procedimiento para obtener las subunidades de proteínas.

II.c) *Funcionalización de PRO para generar la PRO* reactiva nucleófila o electrófila, preferiblemente OMPC o una subunidad de la misma para que presente radicales sulfhidrilo reactivos*

La PRO aislada como en II.(b) anterior se funcionaliza a continuación para que presente grupos electrófilos o nucleófilos. La PRO* que se origina puede reaccionar entonces con un Pn-Ps* inversamente funcionalizado como el preparado en II.(a) anteriormente.

1. *Formación de derivados PRO electrofilos:*

La PRO aislada, por ejemplo, la OMPC de *Neisseria* o MIEP de OMPC, se hace reaccionar preferiblemente con un reactivo como éster p-nitrofenílico del ácido N-(bromoacetil)-6-aminocapróico capaz de reaccionar con los grupos ε-amino de la lisina de PRO. El derivado de PRO bromoacetilado resultante puede reaccionar con derivados nucleófilos de Pn-Ps como los preparados en II.(a)1. *supra*.

2. *Formación de derivados PRO nucleófilos:*

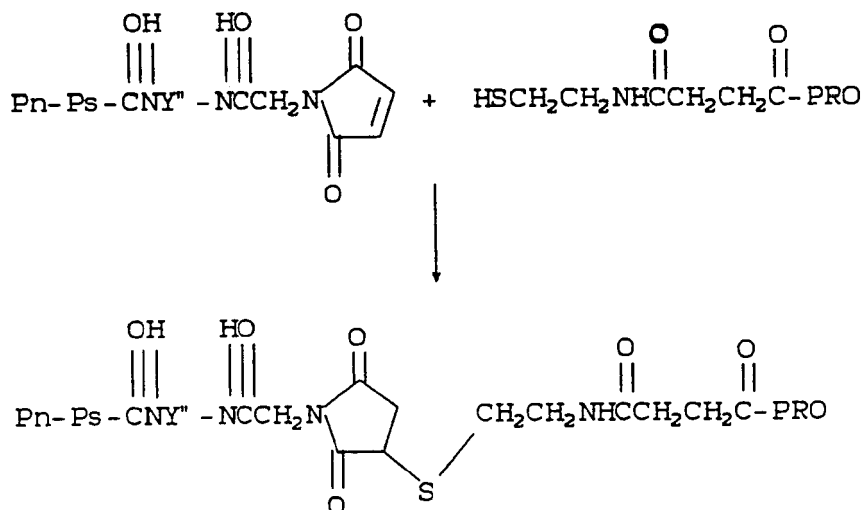
La PRO aislada, por ejemplo, OMPC de *Neisseria* o MIEP, se hace reaccionar con un reactivo como N-acetilhomocisteína tiolactona, generando el derivado sulfhidrilo de la proteína. Este derivado nucleófilo puede reaccionar con un Pn-Ps electrófilo como el preparado en II.(a) 2 anterior. Los resultados típicos de esta fase del procedimiento proporcionan concentraciones de sulfhidrilo de aproximadamente 0,1 a 0,3 μmol/mg de proteína.

II.d) *Conjugación del polisacárido (Pn-Ps) de la etapa II.(a) con la proteína (PRO) de la etapa II.(c)*

Tras la formación de las especies reactivas Pn-Ps y PRO conforme a las etapas II.(a) y II.(c), *supra*, se ponen en contacto los reactivos inversamente activados entre sí en una relación molar de aproximadamente 1:1. Deberá purgarse el aire de la mezcla de reacción mediante nitrógeno, sellarse y dejarse reaccionando a temperatura ambiente durante aproximadamente cuatro días de 17°C a 40°C. Ejemplos de tales reacciones incluyen:

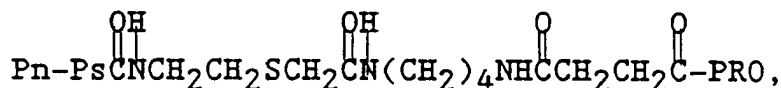
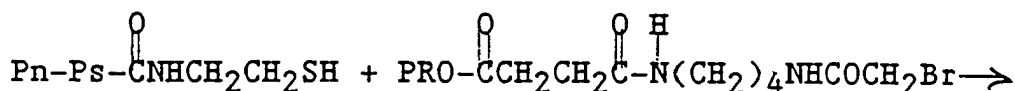


en la que el polisacárido activado que se ha hecho reaccionar con 4-bromoacetamidobutilamida se hace reaccionar con una proteína que se ha hecho reaccionar con N-acetilhomocisteinatlactona, formando un conjugado y:

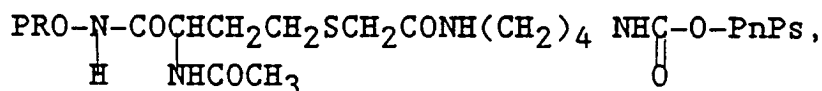


(en la que Y" es un radical alquilo C₂-C₈), en el cual un polisacárido derivatizado con amino que se ha hecho reaccionar con ácido maleimido activado se hace reaccionar con una proteína activada con carboxi que se ha aminado con un aminorol, formando un conjugado.

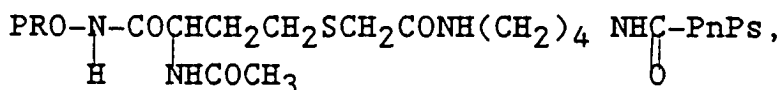
- 5 De igual forma, se puede hacer reaccionar cualquier polisacárido modificado de forma covalente con grupos tiol pendientes con la proteína bacteriana OMPC o MIEP que tenga centros electrófilos proporcionando un conjugado covalente. Un ejemplo de dicha reacción es:



- 20 en la que un polisacárido activado que se ha hecho reaccionar con un aminorol se hace reaccionar con una proteína activada con carboxi que se ha hecho reaccionar con derivados monohaloacetilo de una diamina, formando un conjugado. Una unión muy preferida, conforme a la invención, es el espaciador de fórmula:



- 30 por enlaces mediante los hidroxilos del polisacárido, o



- 40 en el caso de polisacáridos que porten grupos ácido carboxílico.

- En caso de no fuera necesario eliminar la actividad electrófila de un exceso de grupos haloacetilo, la reacción del conjugado con un tiol de bajo peso molecular, como N-acetilcisteamina, realizará este propósito. El uso de este reactivo, N-acetilcisteamina también permite confirmar la cantidad de los radicales haloacetilo usados debido a que la S-carboximetilcisteamina que se forma puede detectarse únicamente por el procedimiento de Spackman, Moore and Stein.

II.e) Formación de un casquete en el conjugado Pn-Ps-PRO para eliminar los grupos funcionales residuales

- 50 Los grupos electrófilos residuales sobre PRO* o Pn-Ps* se extinguen al finalizar la reacción mediante la adición de un exceso molar de aproximadamente 2 a 10 veces respecto a los grupos reactivos residuales sobre el conjugado de un nucleófilo de bajo peso molecular, por ejemplo, N-etilmaleimida (NEM) para formar un casquete en los sulfhidrilos libres residuales o electrófilos, por ejemplo, N-acetilcisteamina para formar el casquete en los radicales bromoacetilo residuales.

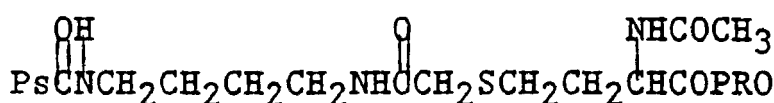
55 II.f) Aislamiento del producto conjugado

- El producto conjugado con casquete se separa de PRO, Pn-Ps no conjugados y otros reactivos por ultracentrifugación o diafiltración. El sedimento conjugado se resuspende en un tampón acuoso de lavado, que puede incluir un tratamiento con detergente, como desoxicolina al 0,5% y sal como Tris 0,1 M, pH 7-9 y aproximadamente EDTA 10 mM para eliminar los pirógenos residuales y se deja reposar a temperatura ambiente durante 1 a 25 horas. El conjugado se vuelve a sedimentar, se resuspende en tampón acuoso sin detergente y luego se vuelve a sedimentar por ultracentrifugación a aproximadamente 100.000 x g usando un rotor de ángulo fijo durante aproximadamente dos horas a aproximadamente 1-20°C o se somete a cualquiera de una serie de procedimientos de purificación distintos, incluyendo diafiltración de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, centrifugación en gradiente u otra cromatografía de adsorción diferencial, para eliminar los polisacáridos y proteínas unidos de forma no covalente, usando ensayos de Ps, Pro y nefelometría diferencial, así como ensayo de covalencia para el espaciador bigenérico (véase más adelante) como procedimientos *in vitro* para el seguimiento de la actividad biológica deseada.

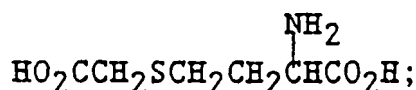
ES 2 121 820 T5

La posterior separación de reactivos puede realizarse por cromatografía de exclusión de tamaño en una columna o en el caso de proteínas no solubles muy grandes, la separación se puede realizar por ultracentrifugación. La resuspensión del conjugado en agua estéril y maduración durante aproximadamente un día a 4°C para completar la solubilización vienen seguidas por una centrifugación a baja velocidad para separar los particulados insolubles. La solución sobrenadante contiene el producto final que puede esterilizarse por filtrado, formularse en composiciones de vacunas a niveles de dosificación inmunológicamente eficaces y rellenarse de forma estéril en viales.

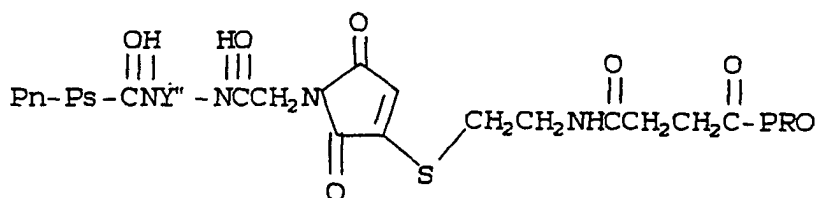
El análisis del conjugado para confirmar la covalencia y, por tanto, la estabilidad del conjugado, se realiza hidrolizando (preferiblemente con HCl 6N a 110°C durante 20 horas) el conjugado, analizando después cuantitativamente el aminoácido único del espaciador estable a la hidrólisis que contiene el enlace tioéter y los aminoácidos constituyentes de la proteína. La contribución de los aminoácidos a la proteína puede eliminarse, si fuera necesario, mediante comparación con el patrón de aminoácidos apropiado para la proteína implicada, reflejando el resto del valor de aminoácidos la covalencia del conjugado, o puede diseñarse el aminoácido del espaciador para que aparezca fuera del patrón de aminoácidos de la proteína en el análisis. El ensayo de covalencia también es útil para controlar los procedimientos de purificación a fin de marcar la mejora de concentración de componentes biológicamente activos. En los ejemplos anteriores, la hidrólisis de



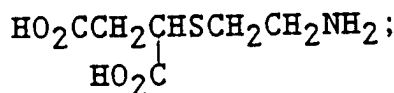
da como resultado la liberación de S-carboximetilhomocisteína,



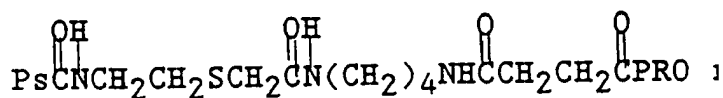
la hidrólisis de



da como resultado la liberación de ácido aminodicarboxílico,



y la hidrólisis de



da como resultado la liberación de S-carboximetilcisteamina, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ mediante la escisión de la molécula de Ps-A-E-S-B-PRO en los enlaces peptídicos y otros enlaces no estables a la hidrólisis. Los procedimientos cromatográficos, como los de Spackman, Moore y Stein, pueden aplicarse entonces convenientemente y determinar la relación de los constituyentes de aminoácidos.

La producción óptima de anticuerpo IgG requiere la colaboración de linfocitos B y T específicos para el antígeno de interés. Los linfocitos T no pueden reconocer polisacáridos pero pueden aportar ayuda para las respuestas del anticuerpo IgG anti-polisacárido si el polisacárido está unido covalentemente a una proteína a la que la célula T es capaz de reconocer.

C. Formulaciones de vacunas y utilidad

En una realización preferida, el producto conjugado se adsorbe sobre gel de hidróxido de aluminio. Esto se realiza, por ejemplo, mediante la preparación de una solución madre conjugada equivalente a una concentración de 20 µg/ml de Pn-Ps. Pueden diluirse porciones 1:1, 1:5 y 1:10 con agua estéril. Las porciones de cada una de estas muestras, incluyendo una porción de la solución madre 20 µg/ml, se diluyen 1:1 con un diluyente de hidróxido de aluminio que contiene 0,85 mg/ml de Al³⁺, NaCl al 1,7% (p/v) y 100 µg/ml de timerosal. El pH de la solución se ajusta a aproximadamente 7,5 con NaOH 1N, dando lugar a soluciones que tienen una concentración de Pn-Ps de 10, 5, 2 y 1 µg/ml. Dosis de aproximadamente 0,1 ml a 0,75 ml de cada una de estas formulaciones son apropiadas para la administración a receptores de diferente edad e intervalo de peso. Se ha encontrado que la vacuna formulada como se ha descrito induce respuestas inmunitarias de los polisacáridos antineumocócicos significativas y específicas del subtipo en monos lactantes de 2-3 meses para Pn6B-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC y Pn23F-Ps-OMPC. Además, se ha encontrado que la vacuna conjugada Pn-Ps-OMPC depende de las células T en ratones atímicos.

A partir de esta descripción, es evidente que otros polisacáridos que poseen propiedades como las definidas en la presente y procedimientos para la preparación de Ps que poseen dichas propiedades, tendrán una aplicación útil en la preparación de conjugados diferentes a los que comprenden polisacáridos neumocócicos parcialmente hidrolizados y fraccionados. Estos conjugados se podrían usar entonces para evitar enfermedades provocadas por otros organismos patógenos. Por ejemplo, podrían usarse como fuente de polisacáridos el grupo streptococci B, una causa de meningitis neonatal, *Neisseria meningitidis* B o C, una causa de meningitis infantil, o *E. coli*, una causa importante de infecciones del tracto urinario y otras infecciones oportunistas. Estos polisacáridos, así como el Pn-Ps y los conjugados covalentes del mismo, pueden proporcionar además importantes componentes para formulaciones de vacunas de combinación. Tales combinaciones pueden, por ejemplo, incluir cantidades inmunológicamente eficaces de coadyuvantes, como compuestos de Freund, Ribi o inmunomoduladores, como interleucinas, interferones (véase, por ejemplo, los compuestos enumerados en: *Market Letter*, 30 de Nov. de 1987, pág. 26-27; *Genetic Engineering News*, enero de 1988, vol. 8, pág. 23) o inmunógenos adicionales. En una realización preferida, se incluye una composición que comprende cantidades inmunológicamente eficaces del conjugado de la presente invención con una o más vacunas contra la hepatitis B, hepatitis A, hepatitis no A, no B, SIDA, difteria, tos ferina, tétanos, sarampión, paperas, rubeola, varicela, poliomielitis o *Haemophilus influenzae* b. Vacunas adicionales preferidas, seleccionadas entre las anteriormente citadas se seleccionan entre PevaxHIB®, RecobivaxHB®, M-M-R® y una vacuna DTP trivalente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

Preparación de OMPC Serotipo 2 de *Neisseria meningitidis* B11

A. Fermentación

1. Grupo B11 de *Neisseria meningitidis*

Se abrió un tubo que contenía el cultivo liofilizado de *Neisseria meningitidis* (obtenido de Dr. M. Artenstein, Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Washington, D.C.) y se añadió Eugonbroth (BBL). El cultivo se añadió en cultivos inclinados en agar Mueller Hinton y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 36 horas, momento en el que se recogió el cultivo en medio de leche descremada al 10% (Difco) y se congelaron alícuotas a -70°C. La identidad de los organismos se confirmó por aglutinación con antisuero específico suministrado por WRAIR y suero de tipaje suministrado por Difco.

Se descongeló un vial del cultivo del segundo paso y se añadió sobre 10 placas de agar de sangre de cordero Columbia (CBAB-BBL). Las placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 18 horas, después de lo cual se recogieron los cultivos en 100 ml de medio de leche descremada al 10%, se tomaron alícuotas en cantidades de 0,5 ml y se congelaron a -70°C. El organismo se identificó positivamente por aglutinación con antisuero específico, fermentación en azúcar y tinción Gram.

Se descongeló un vial del cultivo de este paso, se diluyó con medio de cultivo Mueller-Hinton y se añadió sobre 40 placas de agar Mueller-Hinton. Las placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 6% durante 18 horas, después de lo cual se recogió el cultivo en 17 ml de medio de leche descremada al 10%, se tomaron alícuotas en cantidades de 0,3 ml y se congelaron a -70°C. El organismo se identificó positivamente por tinción Gram, aglutinación con antisuero específico y ensayo de oxidasa.

ES 2 121 820 T5

2. Fermentación y recogida de la pasta celular

a. Desarrollo del inóculo

- 5 El inóculo se desarrolló a partir de un vial congelado de *Neisseria meningitidis* Grupo B, B-11, anterior (paso 4). Se inocularon diez placas inclinadas de agar Mueller-Hinton y se recogieron seis aproximadamente 18 horas después y se usaron como inóculo para 3 matraces de 250 ml de medio dializado de levadura de Gotschlich a pH 6,35. La OD₆₆₀ se ajustó a 0,18 y se incubó hasta que la OD₆₆₀ variaba entre 1 y 1,8. Se usó 1 ml de este cultivo para inocular cada uno de 5 matraces de Erlenmeyer de 2 l (cada uno contenía un 1 l de medio; véase más adelante) y se incubaron a 37°C en un agitador a 200 rpm. La O.D. se controló a intervalos de una hora después de la inoculación. Se produjeron 4 litros de medio de cultivo a una OD₆₆₀ de 1,28.

Fermentador de siembra de 70 litros

- 15 Se usaron aproximadamente 4 litros de cultivo de siembra para inocular un fermentador estéril de 70 litros que contenía aproximadamente 40 litros de medio de producción completo (véase más adelante). Las condiciones de la fermentación de 70 litros incluían 37°C, 185 rpm con inyección de aire a 10 litros por minuto y control del pH constante a aproximadamente pH 7,0 durante aproximadamente 2 horas. Para este lote, la OD₆₆₀ final fue de 0,732 después de 2 horas.

Fermentador de producción de 800 litros

- 20 Se usaron aproximadamente 40 litros del cultivo de siembra para inocular un fermentador estéril de 800 litros que contenía 568,2 litros de medio de producción completo (véase más adelante). El lote se incubó a 37°C, 100 rpm con 60 litros/minuto de inyección de aire y control del pH constante a pH 7,0. Para este lote, la OD final fue de 5,58, trece horas después de la inoculación.

3. Medio completo para matraces de Erlenmeyer y fermentadores de 70 y 800 litros

- 30 Fracción A

Ácido L-glutámico	1,5 g/litro
NaCl	6,0 g/litro
Na ₂ HPO ₄ anhidro	2,5 g/litro
NH ₄ Cl	1,25 g/litro
KCl	0,09 g/litro
L-cisteína HCl	0,02 g/litro

- 45 Fracción B (*Dializado de levadura de Gotschlich*):

- Se disolvieron 1280 g de Extracto de Levadura de Difco en 6,4 litros de agua destilada. La solución se dializó en 2 unidades de diálisis de fibra hueca Amicon DC-30 con tres cartuchos H10SM. Se disolvieron 384 g de MgSO₄ 7H₂O y 3200 g de dextrosa en el dializado y se diluyó el volumen total a 15 litros con agua destilada. El pH se ajustó a 7,4 con NaOH, se esterilizó por paso a través de un filtro de 0,22 µm y traspasó al fermentador que contenía la Fracción A.

- 55 Para los matraces de Erlenmeyer: Se añadieron 1 litro de Fracción A y 25 ml de Fracción B y se ajustó el pH a 7,0-7,2 con NaOH.

Para el fermentador de 70 litros: Se añadieron 41,8 litros de Fracción A y 900 ml de Fracción B y se ajustó el pH a 7,0-7,2 con NaOH.

- 60 Para el fermentador de 800 litros: Se añadieron 553 litros de Fracción A y 15,0 litros de Fracción B y se ajustó el pH a 7,1-7,2 con NaOH.

b. Recogida e Inactivación

- 65 Después de completarse la fermentación, se añadió fenol en un recipiente separado, al cual se traspasó el medio de cultivo celular, proporcionando una concentración final de fenol de aproximadamente 0,5%. El material se mantuvo a temperatura ambiente con agitación suave hasta que el cultivo ya no fue viable (aproximadamente 24 horas).

ES 2 121 820 T5

c. Centrifugación

Aproximadamente después de 24 horas a 4°C, se centrifugaron los 614,4 litros de líquido de cultivo inactivado en centrifugas de flujo continuo Sharples. El peso de la pasta celular después del tratamiento con fenol fue de 3,875 kg. Como alternativa, el medio de fermentación inactivado con fenol se recogió por diafiltración como se divulga más adelante.

B. Aislamiento de OMPC

10 Etapa 1

Concentración y diafiltración

El cultivo inactivado con fenol se concentró hasta aproximadamente 30 litros y se diafiltró en agua destilada estéril usando filtros de fibra hueca de 0,2 μm (ENKA).

Etapa 2

20 Extracción

Se añadió a las células diafiltradas concentradas un volumen igual de tampón 2X TED (tampón TRIS 0,1M, EDTA 0,01M, pH 8,5, con desoxicolato sódico al 0,5%). La suspensión se traspasó a un depósito de temperatura controlada para la extracción de OMPC a 56°C con agitación durante 30 minutos.

El extracto se centrifugó a aproximadamente 18.000 rpm en una centrífuga de flujo continuo Sharples a un caudal de aproximadamente 80 ml/minuto, a aproximadamente 4°C. El líquido sobrenadante viscoso se recogió entonces y se almacenó a 4°C. Los sedimentos celulares extraídos se volvieron a extraer en tampón TED como se ha descrito anteriormente. Los líquidos sobrenadantes se agruparon y almacenaron a 4°C.

30 Etapa 3

Concentración por ultrafiltración

El extracto agrupado se traspasó a un recipiente de temperatura controlada unido a filtros AG-Tech de polisulfona de 0,1 μm . La temperatura del extracto se mantuvo a 25°C en el recipiente durante todo el procedimiento de concentración. La muestra se concentró diez veces a una presión promedio a través de la membrana entre 75,9 y 165,6 kPa.

40 Etapa 4

Recogida y lavado de OMPC

El retenido de la Etapa 3 se centrifugó a aproximadamente 160.000 x g (35.000 rpm) a aproximadamente 70°C en una centrífuga de flujo continuo a un caudal de 300 a 500 ml/minuto, y se descartó el líquido sobrenadante.

El sedimento de OMPC se suspendió en tampón TED (190 ml de tampón; 20 mg/l de sedimento) y se repitieron dos veces la etapa 2 y la etapa 4 (obviando la etapa 3).

Etapa 5

50 Recuperación de OMPC producto

Los sedimentos lavados de la Etapa 4 se suspendieron en 100 ml de agua destilada con una varilla de vidrio y un homogeneizador Dounce para asegurar una suspensión completa. La suspensión acuosa de OMPC se esterilizó entonces por filtrado mediante paso por un filtro de 0,22 μm y se reemplazó el tampón TED por agua por diafiltración frente a agua destilada estéril usando un filtro de fibra hueca de 0,1 μm .

Ejemplo 2

60 Purificación de una Subunidad de OMPC

Preparación de MIEP purificada a partir de OMPC o a partir de células recombinantes por electroforesis en gel de poliacrilamida

Se usaron geles de acrilamida/BIS (37,5:1), 18 x 14 cm, 3 mm de espesor. El gel de acumulación fue poliacrilamida al 4% y el gel de separación fue poliacrilamida al 12%. Se usaron aproximadamente 5 μg de proteína OMPC o proteína de la célula huésped recombinante por gel. Se añadieron 0,5 ml de tampón de muestra (glicerol al 4%, DTT 300 mM, TRIS 100 mM, azul de bromofenol al 0,001%, pH 7,0) a 1 ml de OMPC. La mezcla se calentó a 105°C durante 20

ES 2 121 820 T5

minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de cargar sobre el gel. El gel se hizo funcionar a 200-400 miliamperios, con enfriamiento, hasta que el azul de bromofenol llegó al fondo del gel. Se cortó una tira vertical del gel (aproximadamente 1-2 cm de anchura) y se tiñó con Coomassie/acetato cúprico (0,1%). La tira se destiñó hasta que la banda MIEP (aproximadamente 38 kD) se hizo visible. La tira se colocó entonces en su posición original en el gel y se separó el área MIEP del resto del gel usando un escalpelo.

El área separada se cortó en cubos (aproximadamente 5 mm) y se eluyó con tampón TRIS 0.01M, pH 8,1. Después de 2 ciclos de elución, se evaluó la pureza del eluato por SDS-PAGE. El eluato se combinó con un grupo común de eluatos y dializó durante 48 horas frente a ácido fórmico-amoniaco 60 mM, pH 10. Como alternativa, la proteína eluida se puede dializar frente a ácido acético al 50% en agua. Después de la diálisis, la proteína eluida se evaporó a sequedad. El material se purificó adicionalmente haciéndolo pasar por una columna de clasificación volumétrica PD10 (Pharmacia, Piscataway, NJ), y se almacenó a temperatura ambiente.

Ejemplo 3

Cultivo de subtipos de *Streptococcus pneumoniae* y aislamiento de Pn-Ps bruto

I. Cultivo de *Pneumococci*

Los procedimientos para el cultivo de neumococos son bien conocidos en la técnica [Chase, M.W., *Methods of Immunology and Immunochemistry*, 1, 52, (1967)]. Están disponibles aislados de subtipos neumocócicos de la ATCC. Las bacterias se identifican como diplococos con forma de lanza, Gram-positivas, sin motilidad y encapsuladas que son alfa-hemolíticas sobre agar en sangre. Los subtipos se diferencian en base a la reacción de Quelling usando antisuero específico. Se mantienen cultivos principales y madre de siembra preferiblemente liofilizados o por debajo de 8°C. En un procedimiento de cultivo preferido, se restituyen cultivos madre con Medio de Infusión de Corazón, se cultiva en un Agar de Infusión de Corazón, que contiene sangre de conejo desfibrinada al 10% y se incuba a 37°C±2°C durante aproximadamente 18 horas.

El cultivo de la placa se resuspende en Medio de Infusión de Corazón y se usa una alícuota del cultivo resuspendido para inocular 100 ml de Medio de Infusión de Corazón que contiene sangre de conejo desfibrinada al 10%, que se incuba como cultivo estacionario durante aproximadamente 18 horas a 37°C±2°C. Se comprueba la pureza de los 100 ml del cultivo licuado (siembra de trabajo) por exploración al microscopio de una preparación microscópica Gram-positiva y se reproduce en placas de Agar en Sangre de Infusión de Corazón. La siembra de trabajo se puede almacenar a 2-8°C durante hasta 14 días o usarse inmediatamente. Se inoculan matraces de Erlenmeyer de dos litros u otros recipientes adecuados, que contienen Medio de Inóculo *Pneumococcus* (YUF), que contiene dextrosa (25 g/litro), con siembra de trabajo y se incuban estacionariamente durante aproximadamente 8-24 horas a 37°C±2°C. El período de incubación varía según el tipo de *Streptococcus pneumoniae* que se está cultivando. El pH de la fermentación se ajusta para mantener un pH deseado de 6,0 a 7,2 mediante la adición periódica de solución de bicarbonato sódico al 12% hasta que se alcanza una densidad óptica de 1,5 a 4,0. La densidad óptica se controla a 660 nanómetros. Se examina al microscopio una muestra del cultivo y se realiza una reacción de aglutinación serológica para comprobar la pureza. El cultivo de esta etapa se traspa a un fermentador de siembra que contiene 40 litros de medio de fermentación de neumococos compuesto por agua destilada, una carga seca de los componentes para el medio de siembra de *Pneumococcus* (YUF), Ultrafiltrado de Extracto de Levadura, UCON y dextrosa (aproximadamente 25 g/l). El cultivo se incuba a 37°C±2°C con agitación suave durante aproximadamente 2-12 horas. El pH se controla de 6,0 a 7,2 mediante la adición periódica de solución de hidróxido sódico. Se inocula con aproximadamente 50 litros de un cultivo de siembra de 2-12 horas un fermentador que contiene 525 litros de Medio de Fermentación de neumococos, compuesto por agua destilada, una carga seca de los componentes para el medio de producción de *Pneumococcus* (YUF), Ultrafiltrado de Extracto de Levadura, UCON y dextrosa (aproximadamente 25 g/l). El cultivo se incuba a 37°C±2°C con agitación suave durante 6-30 horas dependiendo de qué tipo se esté cultivando. El pH se controla a 6,0-7,2 mediante adiciones periódicas de solución de hidróxido sódico. La fermentación va seguida por la determinación de la densidad óptica y la fermentación finaliza cuando la dextrosa se ha usado completamente como se indica por la ausencia de cambios en el pH.

Los organismos patógenos se exterminan inmediatamente después de terminar la fermentación. Esto se realiza mediante la adición de fenol a una concentración de aproximadamente 1% y se deja transcurrir la inactivación durante 2-12 horas a temperatura ambiente.

II) Aislamiento de Pn-Ps bruto

Se añade alcohol desnaturalizado al cultivo inactivado en cantidad suficiente para precipitar los restos celulares y ácidos nucleicos, que se eliminan por centrifugación. El polisacárido bruto precipita entonces en el líquido sobrenadante mediante la adición de más etanol desnaturalizado. Los sólidos se recogen por centrifugación y se descarta el líquido sobrenadante.

La contaminación por ácido nucleico se reduce por solubilización del polisacárido en una solución acuosa neutra como acetato sódico al 1-5%, o tampón fosfato 0,05M al que se añade nucleasa y cloruro magnésico aproximadamente 0,01M. Después de aproximadamente 60-120 minutos a aproximadamente 36°C, se ajusta el pH a aproximadamente 8,0 y se añade una proteasa como tripsina para digerir los contaminantes proteínicos.

ES 2 121 820 T5

Se pueden eliminar impurezas adicionales por reprecipitación del polisacárido en acetato sódico con alcohol desnaturalizado o isopropanol, seguida por resolubilización en agua destilada. La adición de bromuro de cetrimonio a aproximadamente 8°C precipita impurezas que se eliminan por centrifugación. La adición de acetato sódico y una alícuota de alcohol desnaturalizado o isopropanol permite la eliminación de impurezas adicionales. El polisacárido se recupera mediante la adición de más alcohol y centrifugación. El precipitado se lava con etanol absoluto hasta que se obtiene un polvo blanco. El polisacárido se recoge por filtración, se lava con etanol absoluto y acetona y se seca a vacío proporcionando el Pn-Ps bruto como un polvo.

Ejemplo 4

Preparación de Pn6B-Ps parcialmente hidrolizado y purificado

- (1) Hidrólisis térmica: Se solubilizó una porción de 3,0 g de Pn6N-Ps bruto en 1200 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas y se almacenó a 4°C durante la noche. La solución se hidrolizó después en un aparato condensador de reflujo refrigerado a 100°C durante 24 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió acetato sódico (59,7 g) a una concentración final del 3% (p/v).
- (2) Sonda serológica: Un estudio piloto de fraccionamiento en isopropanol (IPA) y ensayo de Nefelosa con punto final dirigido por anticuerpos, realizado en una porción de muestra de 10 ml mostró que el Pn6B-Ps precipitaría a un 40-50% de IPA.
- (3) Primera Adición de IPA: La muestra hidrolizada (volumen de 1210 ml, de la etapa 1 anterior) se llevó a IPA al 45% mediante la adición de 932 ml de IPA (añadidos gota a gota con agitación a temperatura ambiente). La muestra se dejó agitando durante 15-30 minutos y luego se centrifugó a 11.000 x g durante 30 minutos (rotor Beckman JA-10, 8.000 rpm; 20°C). El sedimento se trituró con EtOH absoluto en un frasco Omnimix de 250 ml, luego se recogió en un embudo de vidrio sinterizado de 60 ml. El precipitado se lavó directamente en el embudo con EtOH absoluto, seguido de acetona y se secó a vacío sobre CaCl₂ a temperatura ambiente en preparación para análisis.
- (4) Segunda adición de IPA y recuperación del producto: El líquido sobrenadante del IPA al 43,5% [volumen=2020 ml, de la etapa 3 anterior] se llevó hasta IPA al 46,0% añadiendo 93,5 ml de IPA gota a gota mientras se agitaba a temperatura ambiente. La muestra se maduró y se centrifugó como en la etapa 3 anterior. El sedimento se trituró, recogió, lavó y secó como en la etapa 3 anterior. El Pn6B-Ps producto pesó 1.650 mg y tenía un K_d de 0,62 y un contenido en fósforo de 3,3%.

Ejemplo 5

Conjugado 6B-OMPC de S. pneumoniae, Pn6B-Ps-OMPC

A. Preparación de Resina Dowex 50x2 en tetrabutilamonio [Dowex 50 (Bu₄N⁺)]I

Se suspendió en agua la forma protonada de Dowex 50x2 (tamiz malla 200-400) (72 g), se cargó en una columna y lavó secuencialmente con agua, HCl 6N y luego agua hasta que el efluente fue neutro al papel pH. Se inyectó entonces una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio en la columna hasta que el efluente demostró ser fuertemente alcalino. Finalmente, se inyectó agua en la columna hasta que el efluente volvió a ser neutro.

B. Pn6B(Bu₄N⁺)

Se disolvió Pn6B-Ps (600 mg), de tamaño reducido y fraccionado (véase la Tabla I, Pn6B-Ps, lote 1, para sus propiedades físicas) en agua destilada estéril (60 ml) y se agitó por medios magnéticos la solución hasta que todos los sólidos estuvieron disueltos (1,5 horas). La solución de polisacárido se cargó en una resina enjuagada y se dejó pasar por el lecho por gravedad (4,5 horas). La columna se lavó con agua (10-12 ml) y los efluentes combinados se liofilizaron, proporcionando 640 mg de sal tetra-n-butil amonio de Pn6B-Ps seca, Pn6B(n-Bu₄N⁺).

C. Pn6B-BuA₂

Se disolvió Pn6B(n-Bu₄N⁺) (640 mg) en sulfóxido de dimetilo (DMSO) (24 ml) y se agitó por medios magnéticos durante 30 minutos, momento en el cual todos los sólidos parecían estar disueltos. A esta mezcla se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (44,2 mg) y la reacción se agitó a temperatura ambiente (60 min). En un matraz separado, se hizo básica (pH 10,2) una solución de diclorhidrato de butanodiamina (BuA₂2HCl, 1,022 g) en agua (16 ml) mediante la adición de NaOH 10 N. La solución se filtró en un filtro estéril de 0,2 µm y se enfrió en un baño de hielo. La mezcla de DMSO madurada que contenía el polisacárido activado se añadió a la solución fría de BuA₂2HCl, en una corriente lenta estacionaria y la solución resultante se agitó a 0°C (15 minutos). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora más, después de lo cual se traspasó a un tubo de diálisis y dializó (4°C) frente a lo siguiente: 1] 15 l de tampón fosfato sódico pH 7,0, 0,1 M durante 6 horas; 2] 15 l de tampón fosfato sódico pH 7,0 0,01M, 12 horas; 3] 15 l de tampón fosfato sódico pH 7,0 0,01M, 9 horas; 4] 15 l de agua destilada, 17,5 horas. El contenido del tubo de diálisis se liofilizó, proporcionando 222 mg de Pn6B-1,4-butanodiamina (Pn6B-

ES 2 121 820 T5

BuA₂). La RMN (300 MHz, D₂O) de aproximadamente 5 mg de este material mostró una carga de 22 restos diamina por 100 unidades de monómero repetitivo de Pn6B-Ps, comparando las integrales de las resonancias de los metilenos de butano diamina y los protones de metilo de ramnosa del Pn6B-Ps.

Pn6B-BuA₂-BrAc

Se disolvió Pn6B-BuA₂ (210 mg) en tampón fosfato-borato de Kolthoff 0,1M, pH 9,04 (21 ml) y se agitó magnéticamente la mezcla durante 30 minutos para solubilizar. A esta solución acuosa se añadió una mezcla compuesta por bromoacetato de p-nitrofenilo (210 mg) en acetonitrilo (2,6 ml) y se agitó la reacción durante la noche (20 horas, 4°C). La solución se traspasó a un tubo de diálisis y se dializó (4°C) frente a lo siguiente: 1] 15 l de agua destilada estéril, 12,3 horas; 2] 15 l de agua destilada estéril, 8,25 horas; 3] 15 l de agua destilada estéril, 5,5 horas. Del contenido de la bolsa, se extrajeron 1,7 ml para su ensayo (RMN y calibración universal por HPSEC o análisis de exclusión molecular) y luego se añadieron 0,449 g de sal de tampón fosfato a pH 8 secada (preparada por liofilización de una solución de fosfato sódico 0,1 M, pH 8). Después de completar la disolución (30 min), se filtró la solución por un filtro estéril de 0,2 µm, proporcionando una solución de pH 8 de Pn6B-BuA₂-BrAc.

Pn6B-OMPC

Se sedimentó por ultracentrifugación OMPC estéril (40 ml, 4,5 mg/ml) (4°C, 43 krpm, 2 horas) en cuatro tubos de centrífuga de 10 ml. Cada sedimento se resuspendió en 3 ml de mezcla de tiolación esterilizada por filtrado (0,22 µm) que estaba formada por lo siguiente: clorhidrato de N-acetilhomocisteína tiolactona (164 mg), sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético (255 mg) y ditiotretol (53 mg) en tampón Na₂B₄O₇, pH 11,09 (30 ml). Los sedimentos resuspendidos se homogeneizaron (Dounce), combinaron, se desgasificaron los recipientes y cubrieron con nitrógeno y se maduraron durante la noche (19 horas) a temperatura ambiente. La solución se dividió en tres tubos de ultracentrifuga, se cubrió con KH₂PO₄ 1M y se sedimentó la proteína (4°C, 43 krpm, 2 horas). Los sedimentos se resuspendieron en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 8 (30 ml), se homogeneizaron (Dounce) y se volvieron a sedimentar (4°C, 43 k rpm, 2 horas). El sedimento de proteína estéril se usó resuspendido en la solución de Pn6B-BuA₂-BrAc filtrada. Se realizó inmediatamente un ensayo de Ellman y mostró una concentración de SH de 34 µmol. La mezcla de reacción se desgasificó, cubrió con nitrógeno y maduró durante 91 horas a temperatura ambiente.

Se colocó un casquete a la proteína mediante la adición de 1 ml de una solución (esterilizada por filtrado, 0,22 µm) compuesta por lo siguiente: N-etilmaleimida (75 mg) en 5 ml de tampón fosfato sódico 0,1M, pH 8,0. Esta mezcla se maduró durante 4 horas a temperatura ambiente, después de lo cual, se añadieron 300 µl de N-acetil cisteamina (esterilizada por filtrado, 0,22 µm) y la solución se maduró durante otras 19,5 horas.

El conjugado estéril con el casquete formado se dividió en dos tubos de centrífuga, se rellenó con tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7 y se sedimentó por ultracentrifugación (4°C, 43 k rpm, 2 horas), luego se resuspendió y homogeneizó (Dounce) en tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7 (42 ml) estéril. Después de la recentrifugación como anteriormente, los sedimentos se resuspendieron en un homogeneizador Dounce en un total de 50 ml de agua destilada estéril. Después de maduración durante 17 horas a 4°C, se centrifugó la preparación de conjugado a 1000 rpm durante 3,5 minutos en un rotor TH 4 en una centrífuga TJ-6 y se retiró una pequeña cantidad de sedimento de polisacárido. Se ensayaron proteínas en la suspensión de conjugado producto final (Lowry), Pn6B-polisacárido (fenol/ácido sulfúrico), polisacárido no conjugado (cromatografía de exclusión molecular - nefelometría diferencial) y aminoácidos (análisis de aminoácidos). Los resultados fueron los siguientes:

Pn6B-polisacárido	0,33 mg/ml
Proteína	2,2 mg/ml
Pn6B-Ps/OMPC	0,15
Pn6B-Ps libre	< 5% del área
S-carboximetilhomocisteína/lisina	7,7%
S-carboximetilcisteamina/lisina	1,6%

Ejemplo 6

Preparación de Pn14-Ps parcialmente hidrolizado y purificado

- Tratamiento con resina de intercambio aniónico: Se solubilizó una porción de 2,81 g de polvo de Pn14-Ps en 1124 ml de agua destilada con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas y luego se almacenó a 4°C durante la noche. La solución se añadió a 60 gramos de DE52 (Whatman, dietilamino-etilcelulosa) que se había hinchado previamente durante aproximadamente 15 horas en agua destilada a pH aproximado de 5-6. La suspensión se agitó suavemente en un agitador de plataforma a temperatura ambiente

ES 2 121 820 T5

durante aproximadamente 15 horas, después de lo cual se centrifugó en un rotor Beckman JA-10 a 5.000 rpm durante 15 minutos a 20°C. El líquido sobrenadante se aclaró adicionalmente en un embudo de vidrio sinterizado (150 ml, porosidad del medio) y se recogió en un matraz de 2 litros con brazo lateral.

- (2) Hidrólisis sónica: El Pn14-Ps tratado con DE52 (volumen - 1.100 ml, de la etapa 1 anterior) se sometió a tratamiento sónico en un vaso de precipitados de plástico en un baño de hielo con un Sonicador Branson (sonda de media pulgada, en posición 8) durante 2 minutos. La muestra se dejó enfriar durante aproximadamente 15 minutos mientras se determinaba la viscosidad y luego se sometió a tratamiento sónico durante intervalos adicionales de 1 minuto. Se alcanzó una viscosidad final de 1,096 centistokes después del último tratamiento sónico. La muestra hidrolizada se llevó a temperatura ambiente y se añadió reactivo de acetato sódico (18,0 g) a una concentración final de 1% (p/v).
- (3) Sonda serológica: Un estudio piloto de fraccionamiento en isopropanol (IPA) y ensayo de Nefelosa con punto final dirigido por anticuerpos, realizado en una porción de muestra de 10 ml mostró que el Pn14-Ps precipitaría a un 35-45% de IPA.
- (4) Primera Adición de IPA: La muestra hidrolizada (volumen de 1090 ml, de la etapa 2 anterior) se llevó a IPA al 39,3% mediante la adición de 706 ml de IPA (añadidos gota a gota con agitación a temperatura ambiente). La muestra se dejó agitando durante 15-30 minutos y luego se centrifugó a 11.000 x g durante 30 minutos (rotor Beckman JA-10, 8.000 rpm; 20°C) y se decantó el líquido sobrenadante. El sedimento residual se trituró con EtOH absoluto en un frasco Omnimix de 250 ml, luego se recogió en un embudo de vidrio sinterizado de 60 ml. El precipitado se lavó directamente en el embudo con EtOH absoluto, seguido de acetona y se secó a vacío sobre CaCl₂ a temperatura ambiente en preparación para análisis.
- (5) Segunda adición de IPA y recuperación del producto: El líquido sobrenadante del IPA al 39,3% [volumen=1712 ml, de la etapa 4 anterior] se llevó hasta IPA al 41,8% añadiendo 73,5 ml de IPA gota a gota mientras se agitaba a temperatura ambiente. La muestra se maduró y se centrifugó como en la etapa 4 anterior. El sedimento se trituró, recogió, lavó y secó como en la etapa 4 anterior. El Pn14-Ps producto pesó 1.399 mg.
- (6) Diálisis y liofilización: Se solubilizó una porción (1385,6 mg) de la muestra de la Etapa 5 anterior en 554 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante 2-3 horas. La solución (2,5 mg/ml) se traspasó a un tubo de diálisis (separación de PM 12.000; 45 mm) y se dializó frente a agua destilada durante 27 horas con 2 cambios adicionales de agua destilada. A continuación se traspasó la muestra dializada a matraces de liofilización, se congeló girando en un baño de hielo seco:metanol y se liofilizó en un liofilizador Virtis (Freezemobile) durante dos días y medio hasta sequedad. La recuperación del Pn14-Ps producto final fue de 1326,8 mg, con un K_d de 0,56.

De esta descripción es evidente para los expertos en la técnica que podrían prepararse otros subtipos de Pn-Ps neutros, como Pn7F-Ps, conforme al procedimiento aquí descrito y conjugarse como Pn14-Ps que también es un polisacárido neutro.

Ejemplo 7

Conjugación del Complejo de la Proteína de Membrana Externa con el polisacárido neumocócico 14, Pn14-Ps-OMPC

a: Preparación del derivado 1,4-butanodiamina de Pn14-Ps (Pn14-BuA2)

Se cubrió una porción de 410 mg de Pn14-Ps después de su almacenamiento a vacío sobre P₂O₅ durante 3 horas con 26 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se agitó durante 0,75 horas para disolver. Se añadieron 62 mg de carbonil diimidazol y se agitó la solución resultante a temperatura ambiente durante 80 minutos.

Se preparó una solución que contenía 1,067 g de diclorhidrato de 1,4-butanodiamina (BuA₂2HCl) en 38,5 ml de agua y se ajustó su pH a 10,20 con NaOH 2,5 N. Esta solución se filtró en un filtro Millex GV de 0,2 µm y se enfrió en un baño de hielo.

La solución de DMSO madurada se añadió a la solución de BuA₂ fría y se agitó durante otros 10 minutos en el baño de hielo. Se dejó madurar a temperatura ambiente durante 50 minutos, después de lo cual se cargó en dos tubos de diálisis Spectrapor 2 de 30,48 cm de longitud, recortados a 1 cm de la parte superior del líquido y se dializó frente a: 1) 15 l de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,0 durante 16,5 horas; 2) 15 l de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,0 durante 8 horas; 3) 15 l de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,0 durante 8 horas; 4) 15 l de agua durante 17,5 horas. Se liofilizó entonces proporcionando 210 mg del derivado 1,4-butano diamina de Pn14-Ps (Pn14-BuA₂).

Un espectro de RMN de aproximadamente 5 mg de muestra mostró una "carga" de aproximadamente 31 restos de butanodiamina por 100 unidades repetitivas de polisacárido que se definen comparando las integrales de las resonancias de los metilenos de butanodiamina y del metilo de N-acetilo (de Pn14-Ps).

ES 2 121 820 T5

b. Preparación del derivado de butanodiamina bromoacetilado de Pn14-Ps (Pn14-BuA₂-BrAc)

Se cubrió Pn14-BuA₂ (210 mg) con 36 ml de un tampón borato-fosfato 0,1 M, pH 9,0 y se agitó durante 2,5 horas para solubilizar. A continuación, se añadieron 195 mg de bromoacetato de p-nitrofenilo disueltos en 4 ml de acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó 21 horas a 4°C. Se dializó a continuación en tubos Spectrapor 2 frente a: 1) 15 l de agua destilada durante 6 horas, 2) 15 l de agua destilada durante 14,5 horas y, 3) 15 l de agua durante 6 horas. Del contenido dializado de la bolsa, se extrajeron 2,0 ml para los ensayos y luego se añadieron 492 mg de sal de tampón fosfato pH 8,0 seca (preparada por liofilización de una solución a pH 8,0 de fosfato sódico 0,1 M). La solución se filtró en 2 filtros Corning de 0,2 µm dando lugar a una solución acuosa a pH 8,0 de Pn14-BuA₂-BrAc (43 ml).

c. Conjugación de OMPC con Pn14-BuA₂-BrAc-Ps

Se cargaron cincuenta ml de OMPC (concentración 3,2 mg/ml) en cinco tubos de centrífuga de 10 ml y se centrifugaron en un rotor Beckman 80 Ti a 43.000 rpm (43 K) a 4°C durante 2 horas. Se preparó una mezcla de tiolación disolviendo 350 mg de EDTA (sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético) y 64 mg de ditioneitol (DTT) en 30 ml de tampón Na₂B₄O₇, pH 11,0. Se añadieron 346 mg de N-acetilhomocisteína tiolactona y la solución se filtró en un filtro Corning de 0,2 µm (tipo copa).

Los sedimentos de la centrifugación anterior se desalojaron con 3 ml de mezcla de tiolación filtrada (15 ml en total), se traspasaron a un homogeneizador Dounce y resuspendieron. Los tubos se enjuagaron por transferencia en serie de 5 ml adicionales de la solución de tiolación. El procedimiento de enjuagado se repitió con 5 ml adicionales de solución de tiolación. Las aguas de enjuagado combinadas se homogeneizaron en un Dounce y el material resuspendido total (25 ml) se traspasó a un matraz de fondo redondo de 100 ml.

Después de cerrar herméticamente con un septo y reemplazar el aire por N₂ usando una válvula Firestone, la mezcla de reacción se dejó madurar durante 21 horas. La mezcla de reacción de 25 ml se dividió entonces en tres tubos de centrífuga, rellenándose cada uno de ellos con KH₂PO₄ 1M (acuoso) y centrifugando luego durante 2 horas a 43K rpm y 4°C. Los líquidos sobrenadantes se eliminaron y se resuspendieron los sedimentos en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 8,0 (el volumen de la resuspensión final fue en total de 30 ml).

Se realizó entonces una segunda ultracentrifugación (2 horas, 4°C, 43 k rpm). Después de eliminar el líquido sobrenadante, se resuspendieron los sedimentos por el procedimiento Dounce en la solución filtrada de Pn14-BuA₂-BrAc preparada anteriormente. Un ensayo de Ellman en este punto indicó un total de 23 µmoles de tiol.

Se apreciará que la filtración de la solución de Pn14-BuA₂-BrAc se produce justo antes de la resuspensión de la proteína tiolada. La reacción resultante (es decir, Pn14-BuA₂-BrAc con OMPC tiolada) se maduró bajo N₂ (con desgasificación) en una recipiente de N₂ a temperatura ambiente durante 114 horas.

La reacción formó el casquete entonces (es decir, se desactivaron los radicales reactivos de Pn14-Ps y OMPC) como sigue: Se añadió una solución que contenía 75 mg de N-etilmaleimida (NEM) en 5 ml de tampón fosfato sódico 0,1M, pH 8,0) y la mezcla se dejó madurar durante 22,5 horas más.

La mezcla de reacción con el casquete formado (35 ml) se dividió en 4 tubos de centrífuga y se centrifugó (43K, 2 horas, 4°C). Los sedimentos se resuspendieron en 40 ml de tampón TED (Tris 0,1 M, EDTA 0,01M, DOC al 0,5%, pH 8,5) y se maduraron a temperatura ambiente durante 19 horas. La solución se centrifugó entonces (43 K, 2 horas, 4°C). Los sedimentos se resuspendieron en 40 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 8 y luego se volvieron a centrifugar (43 K, 2 horas, 4°C). Estos sedimentos se resuspendieron en 44 ml de agua y se maduraron a 4°C durante 17 horas. Una centrifugación a baja velocidad (1000 rpm, 3,5 minutos) proporcionó un pequeño sedimento que se descartó. El líquido sobrenadante se separó, proporcionando un conjugado de 43 ml de volumen, con las siguientes características analíticas:

Ensayo	Resultados
a. Contenido en Ps	387 µg/ml
b. Proteína	1.300 µg/ml
Relación Ps/proteína (calc.)	0,30
c. Ps libre	< 5% del área
d. Análisis de aminoácidos	
SCMHC/lisina	9,8%
SCMC/lisina	3,5%

ES 2 121 820 T5

Ejemplo 8

Preparación de Intermedio Pn23F-Ps

- 5 (1) Hidrólisis sónica: Se solubilizó una porción de 3,0 g de Pn23F-Ps en polvo en 1.200 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas. La solución se sometió a tratamiento sónico en un vaso de precipitados de plástico en un baño de hielo con un Sonicador Branson (sonda de media pulgada, en posición 8) durante intervalos de 3 minutos, hasta un total de 15 minutos. La viscosidad se comprobó después de cada intervalo. Después de 15 minutos, se realizó otro tratamiento sónico de 5 minutos para obtener una viscosidad final de 1,206 centistokes. La muestra hidrolizada se llevó a temperatura ambiente y se añadió reactivo de acetato sódico (58,4 g) hasta una concentración final del 3% (p/v).
- 10
- 15 (2) Sonda serológica: Un estudio piloto de fraccionamiento en isopropanol (IPA) y ensayo de Nefelosa con punto final dirigido por anticuerpos, realizado en una porción de muestra de 10 ml mostró que el Pn23F-Ps precipitaría a un 35-45% de IPA.
- 20 (3) Primera Adición de IPA: La muestra hidrolizada (volumen = 1165 ml, de la etapa 1 anterior) se llevó a IPA al 41,0% mediante la adición de 810 ml de IPA (añadidos gota a gota con agitación a temperatura ambiente). La muestra se dejó agitando durante 15-30 minutos y luego se centrifugó a 11.000 x g durante 30 minutos (rotor Beckman JA-10, 8.000 rpm; 20°C). El sedimento residual se trituró con EtOH absoluto en un frasco Omnimix de 250 ml, luego se recogió en un embudo de vidrio sinterizado de 60 ml. El precipitado se lavó directamente en el embudo con EtOH absoluto, seguido de acetona y se secó a vacío sobre CaCl₂ a temperatura ambiente en preparación para análisis.
- 25
- 30 (4) Segunda adición de IPA y recuperación del producto: El líquido sobrenadante del IPA al 41,0% [volumen=1925 ml, de la etapa 3 anterior] se llevó hasta IPA al 43,5% añadiendo 85,0 ml de IPA gota a gota mientras se agitaba a temperatura ambiente. La muestra se maduró y se centrifugó como en la etapa 3 anterior. El sedimento se trituró, recogió, lavó y secó como en la etapa 3 anterior. El Pn23F-Ps producto pesó 1.795 mg.
- 35 (5) Diálisis y liofilización: Se solubilizó una porción (1779 mg) de la muestra de Pn-Ps de la Etapa 4 anterior en 712 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante 3-4 horas. La solución (2,5 mg/ml) se traspasó a un tubo de diálisis (separación de PM 12.000; 45 mm) y se dializó frente a agua destilada durante 27 horas con 2 cambios adicionales de agua destilada. A continuación se traspasó la muestra a matraces de liofilización, se congeló girando en un baño de hielo seco:metanol y liofilizó en un liofilizador Virtis (Freezemobile) durante 2-3 días. La recuperación del Ps producto final fue de 1703 mg. El producto final tenía un K_d = 0,60.

40 Ejemplo 9

Conjugación del Complejo de la Proteína de la Membrana Externa con el Intermedio Pn23F-Ps

a. Preparación de resina Dowex 50x2 (tamiz malla 200-400) en tetrabutilamonio [Dowex 50 (Bu₄N⁺)]

- 45 Se suspendió Dowex 50x2 (tamiz malla 200-400) en forma protonada (72 g) en agua (el agua usada en todos estos procesos era agua exenta de pirógenos, estéril y destilada), se cargó en una columna y se lavó secuencialmente con 1] 800 ml de agua; 2] 400 ml de HCl 6N; 3] 300 ml de agua hasta efluente neutro al papel pH; 4] 250 g de una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio al 10% hasta efluente fuertemente alcalino al papel pH; 5] 750 ml de agua.

b. Preparación de la forma en tetrabutilamonio de Pn23F-Ps [Pn23F(Bu₄N⁺)]

- 55 Se lavó una columna de 34 ml de Dowex 50x2 (Bu₄N⁺) con 70 ml de agua. Se cubrió una porción de 450 mg de Pn23F-Ps de tamaño especificado con 50 ml de agua y agitó durante 0,5 horas. Esta solución se cargó en la columna y se dejó filtrar por gravedad (aproximadamente 2 horas). En este momento se aplicó vacío al fondo de la columna y continuó la elución (a vacío) durante una hora más. La columna se lavó con 25 ml de agua y los efluentes combinados se liofilizaron proporcionando 0,5 g de sal Pn23F(Bu₄N⁺). Esta se almacenó a vacío en un desecador sobre P₂O₅ durante aproximadamente 17 horas.

c. Preparación del derivado de 1,4-butanodiamina de Pn23F-Ps (Pn23F-BuA₂)

- 60 0,5 g de Pn23F(Bu₄N⁺), de la etapa b anterior, se cubrieron con 25 ml de sulfoxido de dimetilo (DMSO) y agitaron durante 15 minutos hasta disolver. Se añadieron a estos 22 mg de carbonil diimidazol (CDI) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas.

- 65 Se preparó una solución que contenía 507 mg de diclorhidrato de 1,4-butanodiamina (BuA₂2HCl) en 32 ml de agua y se ajustó su pH a 10,23 con NaOH 2,5N. Esta solución se filtró en un filtro Millex GV de 0,2 µm y enfrió en un baño de hielo.

La solución de DMSO madurada se añadió a la solución de BuA2 fría y se agitó una hora más en el baño de hielo. Se maduró entonces a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual se cargó la solución en 2 tubos de diálisis de 30,48 cm Spectrapor, recortados a 1 cm de la parte superior del líquido y dializó frente a: 1) 15 l de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,0 durante 16 horas, 2) 15 l de tampón fosfato sódico 0,01 M, pH 7,0 durante 10,5 horas; 3) 15 l de tampón fosfato sódico 0,01 M, pH 7,0 durante 12,5 horas; 4) 15 l de agua durante 10,5 horas. Se liofilizó entonces proporcionando 220 mg del derivado 1,4-butano diamina de Pn23F-Ps (Pn23F-BuA₂).

Un espectro de RMN de aproximadamente 6,9 mg de muestra mostró una “carga” de aproximadamente 23,5 restos de butanodiamina por 100 unidades repetitivas de polisacárido definido comparando las integrales de las resonancias de los metilenos de butanodiamina y del metilo de ramnosa (de Pn23F).

d. *Preparación del derivado de butanodiamina bromoacetilado de Pn23F-Ps (Pn23F-BuA₂-BrAc)*

Se cubrió Pn23F-BuA₂ (214 mg) con 23 ml de un tampón fosfato-borato 0,1M, pH 9,0 y se agitó durante 30 minutos para solubilizar. A continuación, se añadieron 230 mg de bromoacetato de p-nitrofenilo en 6 ml de acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 23 horas a 4°C. Se dializó entonces en 2 tubos Spectrapor frente a: 1) 15 l de agua durante 8 horas, 2) 15 l de agua durante 12 horas y 3) 15 l de agua durante 6 horas. Del contenido dializado de la bolsa se extrajeron 1,5 ml para ensayos y luego se añadieron 490 mg de sal de tampón fosfato pH 8,0 seca (preparada liofilizando una solución de fosfato sódico 0,1M a pH 8,0). La disolución requirió aproximadamente 15 minutos, después de lo cual se filtró con un filtro Corning de 0,2 µm proporcionando una solución acuosa de pH 8,0 de Pn23F-BuA₂-BrAc.

e. *Conjugación de OMPC con Pn23F-BuA₂-BrAc-Ps*

Se cargaron sesenta ml de OMPC (3,1 mg/ml) en seis tubos de centrifuga de 10 ml y se centrifugaron en un rotor Beckman 80-Ti a 43.000 rpm (43K) a 4°C durante 2 horas. Se preparó una mezcla de tiolación disolviendo 260 mg de EDTA (sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético) y 52 mg de ditiotreitól (DTT) en 30 ml de Na₂B₄O₇. Se añadió tiolactona y la solución se filtró con un filtro Corning de 0,2 µm (tipo copa).

Los sedimentos de la centrifugación anterior se desalojaron con 3 ml de mezcla de tiolación filtrada (20 ml en total) y se traspasaron a un homogeneizador Dounce y resuspendieron. Los tubos se enjuagaron por transferencia en serie de 6 ml adicionales de la solución de tiolación. El proceso de enjuagado se repitió con 4 ml adicionales de solución de tiolación. Las aguas de enjuagado combinadas se homogeneizaron en el Dounce y el material total resuspendido (28 ml) se traspasó a un matraz de fondo redondo de 100 ml. Después de cerrar herméticamente con un septo y reemplazar el aire por N₂ usando una válvula Firestone, se maduró la mezcla de reacción durante 19 horas. La mezcla de reacción de 28 ml se dividió entonces en tres tubos de centrifuga, cada uno de los cuales se rellenó con fosfato potásico 1M (acuoso) y luego se centrifugó durante 2 horas a 43K rpm y 4°C en un rotor Beckman 80-Ti. Los líquidos sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en tampón fosfato sódico 0,1M, pH 8,0 (el volumen de resuspensión final fue en total de 30 ml).

Se efectuó una segunda ultracentrifugación (2 horas, 4°C, 43K rpm). Después de eliminar el líquido sobrenadante, se resuspendieron los sedimentos por el procedimiento Dounce en la solución filtrada de Pn23F-BuA₂-BrAc preparada en la sección 7.I.C.3d. Un ensayo de Ellman en este punto indicó un total de aproximadamente 28 µmoles de tiol en la solución resultante.

Se apreciará que la filtración de la solución de Pn23F-BuA₂-BrAc se produce justo antes de la resuspensión de la proteína tiolada. La reacción resultante (es decir, Pn23F-BuA₂-BrAc con OMPC tiolada) se maduró bajo N₂ (con desgasificación) en un recipiente de N₂ a temperatura ambiente durante 117 horas.

Se formó un casquete en la reacción (es decir, los radicales reactivos de Pn23F-Ps y OMPC se desactivaron) como sigue: Se filtró una solución que contenía 75 mg de N-etilmaleimida (NEM) en 5 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 8,0 a través de un filtro de 0,22 µm, se añadió a la reacción y la mezcla se maduró durante 18 horas.

El volumen total de la mezcla de conjugación con el casquete fue de 38,5 ml y se añadieron 1,5 ml de tampón fosfato sódico 0,1M, pH 8,0 para llevar el volumen total a 40 ml. Se cargaron treinta y cinco ml de esta solución en partes iguales en cuatro tubos de centrifuga de 10 ml y se cubrieron cada uno con tampón fosfato sódico 0,1M, pH 8. Estos se centrifugaron a 43K rpm, 2 horas y 4°C. Los líquidos sobrenadantes se eliminaron y cada uno de los sedimentos se desalojó con 8 ml de tampón TED (Tris 1M, pH 8,5, EDTA 0,01M, desoxicolato sódico al 0,5%) y se traspasaron a un homogeneizador Dounce. Los tubos de centrifuga se enjuagaron en serie con 8 ml adicionales de tampón TED y los sedimentos (40 ml en total) se resuspendieron y se maduraron a temperatura ambiente durante 20 horas. El material madurado se centrifugó (como se ha descrito anteriormente) en cuatro tubos de 10 ml a 43 K, 2 horas y 4°C. Cada uno de los sedimentos se desalojó con 8 ml de tampón TED, los tubos se enjuagaron en serie con 8 ml de TED, resuspendieron y centrifugaron como se ha descrito anteriormente. Estos sedimentos se volvieron a suspender en un volumen total de 40 ml de tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7 y volvieron a centrifugar como se ha descrito anteriormente. Los sedimentos se resuspendieron en un total de 44 ml de agua y se maduraron a 4°C durante 17 horas. Se eliminó una pequeña cantidad de insolubles por una centrifugación a baja velocidad (1.000 rpm, 3,5 minutos) proporcionando el producto en el líquido sobrenadante.

ES 2 121 820 T5

El líquido sobrenadante resultante es la sustancia farmacológica, la vacuna conjugada a granel. El conjugado tenía las siguientes características analíticas:

Ensayo	Resultados
a. Contenido en Ps	284 µg/ml
b. Proteína	2025 µg/ml
Relación Ps/proteína (calc.)	0,14
c. Ps libre	< 5% del área
d. Análisis de aminoácidos	
SCMHC/lisina	6,7%
SCMC/lisina	1,6%

Ejemplo 10

Preparación de Pn-Ps por Homogeneización de Gaulin

Se solubilizó polvo neumocócico bruto a una concentración de 1,5 mg/ml en agua mezclando durante la noche a 4°C. Se preparó también una solución más concentrada de Pn-Ps a 10 mg/ml. La adición de CaCl₂ 50 mM fue adecuada para reducir la viscosidad de la solución de 10 mg/ml hasta la viscosidad de la solución de 1,5 mg/ml. El Pn-Ps solubilizado se pasó entonces por un homogeneizador Gaulin, ajustado a una de las cuatro siguientes presiones 13,8, 34,5, 69 ó 103 MPa. El Pn-Ps tratado por cizallamiento se recogió entonces mediante la adición de isopropanol al 60% que se hizo 50 mM en CaCl₂ de una solución madre 2M. El sedimento se lavó con etanol al 100% en una mezcladora universal y se filtro recuperando el Pn-Ps precipitado. El Pn-Ps se lavó sobre el filtro con acetona y luego se secó sobre CaSO₄ (drierita) y se almacenó a -70°C hasta su análisis. Se resuspendieron alícuotas del Pn-Ps tratado por cizallamiento a aproximadamente 1 mg/ml y se analizó el tamaño molecular y polidispersión por calibración universal HPSEC y el índice de antigenicidad por nefelometría diferencial:

Subtipo de Pn-Ps	PM al que la antigenicidad comienza a disminuir	Polidispersión
6B	500.000	1,19
14	300.000	1,15
19F	250.000	1,09
23F	250.000	1,15

Ejemplo 11

Estimulación de las células T de ratón

Este ensayo se realizó para determinar la dependencia/inmunogenicidad sobre las células T en ratones de la vacuna conjugada de Pn-Ps. Este modelo se adoptó debido a que los niños menores de dos años normalmente responden bien a antígenos dependientes de las células T. Los ratones atímicos tienen un epitelio tímico anómalo y por tanto, su respuesta a antígenos dependientes de las células T es significativamente menor que los equivalentes de su camada congénicos normales.

Se inyectó una dilución única de vacuna proporcionando una dosis de 0,5 µg de polisacárido intraperitonealmente en ratones atímicos adultos (nu/nu) y sus equivalentes de la camada de control congénicos (nu/+) el día 0, el 7 y el 28. Los ratones se sangraron una semana después y se ensayaron sus sueros individuales respecto a la respuesta de anticuerpos por radioinmunoensayo (RIA).

En el RIA, se combinó cada suero de ratón con Pn-Ps marcado con ¹⁴C. Se precipitaron entonces todos los complejos antígeno-anticuerpo formados mediante la adición de sulfato amónico saturado. Cada muestra procesada se recató en un contador beta durante un minuto. Los conjugados Pn6B-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn18C-Ps y Pn4-Ps de la presente invención se ensayaron de esta forma y se encontró que conseguían una buena estimulación de las células T en los ratones Nu/+.

Ejemplo 12

Inmunogenicidad de los Conjugados de Pn-Ps en Monos Rhesus Lactantes

5 Este ensayo se realizó para determinar la inmunogenicidad en monos lactantes de conjugado a granel o envases rellenos de vacuna conjugada Pn-Ps-OMPC o Pn-Ps-MIEP. El modelo de mono lactante ha demostrado ser un excelente predictor clínico para la vacuna conjugada PedvaxHIB™ [Vella *et al.*, *Pediatrics*, 5 de abril, suplemento, págs. 668-675 (1990)] y por tanto se seleccionó como modelo para la evaluación de la vacuna conjugada de Pn-Ps.

10 Se inyecta una dosis de vacuna intramuscularmente (0,25 ml en cada uno de dos sitios) en monos lactantes de 2 a 3 meses el día 0 y el 28. Los monos se sangran el día 0, 28 y 42 y se ensayan los sueros individuales para determinar la respuesta de anticuerpos por radioinmunoensayo (RIA).

15 En el RIA, cada suero de mono se combina con Pn-Ps marcado con ¹⁴C. Se precipitan entonces todos los complejos antígeno-anticuerpo formados mediante la adición de sulfato amónico saturado. Cada muestra procesada se recuenta en un contador beta durante un minuto. La respuesta inmunogénica a la vacuna es satisfactoria si al menos el 50% de los animales de ensayo tiene una respuesta de al menos 1 µg de anticuerpo después de recibir dos dosis de vacuna.

20 Pn6B-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC, Pn4-Ps y Pn14-Ps-OMPC han demostrado inducir intensas respuestas de anticuerpos específicos a un tipo de antígeno. Además, una composición tetra-valente compuesta por Pn6B-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC y Pn14-Ps-OMPC, mostró buenas respuestas de anticuerpos anti-Pn-Ps a los cuatro serotipos.

Ejemplo 13

Eficacia protectora de conjugados neumocócicos en chinchillas

30 Se inyectó a cada chinchilla subcutáneamente o intramuscularmente con 0, 0,25, 1,0 ó 4,0 µg de Pn6B-Ps-OMPC adsorbido en Al(OH)₃. Las chinchillas se sangraron a 0, 2, 4, 6 y 8 semanas. Los animales se infectaron de forma provocada con *Streptococcus pneumoniae* 6B ocho semanas después de la inyección y se controlaron cada 1-3 días por otoscopia y timpanometría. Se aspiraron efusiones del oído medio para su cultivo y se sacrificaron los animales dos semanas después de la infección provocada. Los animales sacrificados se analizaron respecto a histopatología del oído medio. Se produjo un 60% de mortalidad en animales que no recibieron conjugado, mientras que incluso la dosis 35 más baja dio como resultado 0% de mortalidad. No existió protección frente a la otitis media purulenta en animales que no recibieron conjugado, mientras que aquellos que recibieron conjugado estuvieron protegidos a niveles entre el 60 y el 100% en todo el intervalo de dosificación.

Ejemplo 14

Respuestas inmunitarias antineumocócicas en niños de 2-5 años

45 Se ensayó la producción de anticuerpos anti-Pn6B-Ps por RIA y ELISA en niños de 2-5 años que recibieron dos dosis de 0,5 ó 5 µg de Pn6B-Ps. Se observaron incrementos significativos de anticuerpos anti-Pn6B-Ps.

Ejemplo 15

50 *Nefelometría diferencial de polisacáridos neumocócicos*

El propósito de este ensayo es determinar el contenido en polisacáridos y el índice de antigenicidad de preparaciones de Pn-Ps libre y conjugado usando nefelometría diferencial.

55 El intervalo de la curva patrón para la nefelometría diferencial difiere para los diferentes Pn-Ps ya que la respuesta por unidad de masa de Pn-Ps, y la porción lineal de la respuesta frente al perfil de concentración de antígeno Pn-Ps difiere para cada Pn-Ps. El ejemplo de procedimiento de la presente es específico para el conjugado Pn6B y no se aplica necesariamente para conjugados de otros tipos de Pn-Ps. Además, las muestras adsorbidas en hidróxido de aluminio y sus patrones respectivos se diluyen en citrato sódico al 3% en lugar de NaCl al 0,9%, como se divulga 60 más adelante. Las muestras y patrones de conjugados acuosos (es decir, no adsorbidos sobre hidróxido de aluminio) se diluyen en NaCl al 0,9% y se diluyen nuevamente hasta las concentraciones nominales que se espera se encuentren en los límites de la curva patrón.

A) Reactivos

65 Solución salina: NaCl acuosa al 0,9%

Sueros anti-Pn-Ps: Se diluyen antisueros (Health Research, Inc., Albany, NY) 30 veces con solución salina.

ES 2 121 820 T5

Patrones: Se preparan patrones de conjugados de Pn-Ps a 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 y 4,0 $\mu\text{g/ml}$ a partir de una solución madre de 387 $\mu\text{g/ml}$, cuya concentración se determina por el ensayo de ácido sulfúrico y fenol para polisacáridos.

- 5 Muestras de ensayo: Se preparan en solución madre de citrato sódico hasta una concentración final de citrato sódico al 3% y diluciones en serie de las muestras de ensayo hasta las concentraciones teóricas de 1,0, 2,0 y 3,0 μg de Pn-Ps/ml.

B) Procedimiento

- 10 Se ensayan todas las muestras y patrones usando un nefelómetro diferencial Beckman ICS usando mediciones por duplicado. Se determina la concentración en las muestras a partir de la curva patrón. Se multiplica la concentración de muestra por el factor de dilución y se promedian los valores para cada muestra de ensayo.

- 15 Como se ha indicado anteriormente, se rechazan para la conjugación las muestras en las que se encuentra que tienen, por este procedimiento, índices de antigenicidad inferiores al 70% a fin de asegurar que el Pn-Ps que se está usando posee las características inmunológicas deseadas.

Ejemplo 16

- 20 *Clonación del DNA genómico que codifica para MIEP*

- Se colocaron en un tubo nuevo aproximadamente 0,1 g de células de *N. meningitidis* inactivadas con fenol (véase el Ejemplo 1). Las células inactivadas con fenol se resuspendieron en 567 μl de tampón TE (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A las células resuspendidas se añadieron 30 μl de SDS al 10% y 3 μl de proteinasa K 20 mg/ml (Sigma). Las células se mezclaron e incubaron a 37°C durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual se añadieron 100 μl de NaCl 5M y se mezclaron a fondo. Se añadieron entonces 80 μl de bromuro de cetiltrimetilamonio al 1% (CTAB) en NaCl 0,7M, se mezclaron a fondo y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. Se añadió un volumen igual (aproximadamente 0,7 a 0,8 ml) de cloroformo/alcohol isoamílico (a una relación de 24:1, respectivamente), se mezcló a fondo y se centrifugó a aproximadamente 10.000 x g durante aproximadamente 5 minutos. La fase acuosa (superior) se traspasó a un nuevo tubo y la fase orgánica se descartó. Se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (a una relación de 25:24:1, respectivamente) a la fase acuosa, se mezcló a fondo y se centrifugó a 10.000 x g durante aproximadamente 5 minutos. La fase acuosa (superior) se traspasó a un nuevo tubo y se añadieron 0,6 volúmenes (aproximadamente 420 μl) de alcohol isopropílico, se mezcló a fondo y se centrifugó el DNA precipitado a 10.000 x g durante 10 minutos. Se descartó el líquido sobrenadante, y se lavó el sedimento con etanol al 70%. El sedimento de DNA se secó y resuspendió en 100 μl de tampón TE y representa el DNA genómico de *N. meningitidis*.

- Se sintetizaron dos oligonucleótidos de DNA que correspondían al extremo 5' del gen MIEP y al extremo 3' del gen MIEP [Murakami, E.C., *et al.*, (1989), *Infection and Immunity*, 57, págs. 2318- 23]. La secuencia del oligonucleótido de DNA específico para el extremo 5' del gen MIEP fue:

5'-ACTAGTTGCAATGAAAAATCCCTG-3'; y para el extremo 3' del gen MIEP fue:

- 5'-GAATTCAGATTAGGAATTTGTT-3'. Estos oligonucleótidos de DNA se usaron como cebadores para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen MIEP usando 10 nanogramos de DNA genómico de *N. meningitidis*. La etapa de amplificación por PCR se realizó conforme a los procedimientos suministrados por el fabricante (Perkin Elmer).

- El DNA de MIEP amplificado se digirió entonces con endonucleasas de restricción *SpeI* y *EcoRI*. El fragmento de DNA de 1,3 kilobases (kb), que contenía la región de codificación completa de MIEP, se aisló por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, y se recuperó del gel por electroelución [Current Protocols in Molecular Biology, (1987), Ausubel, R.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. and Struhl, L., eds. Greene Publishing Assoc.].

- 55 El vector plasmídico pUC-19 se digirió con *SpeI* y *EcoRI*. El DNA de MIEP *SpeI-EcoRI* purificado en gel se ligó en el vector *SpeI-EcoRI* pUC-19 y se usó para transformar la cepa DH5 en *E. coli*. Los transformantes que contenían el vector pUC-19 con el DNA de MIEP de 1,3 kpb se identificaron por cartografía de endonucleasa de restricción y se secuenció el DNA de MIEP para asegurar su identidad.

- 60 Ejemplo 17

Construcción del vector pCl/l.Gall0p(B)ADH1_t

- El promotor Gal 10 se aisló a partir del plásmido YEp52 [Broach, *et al.*, (1983) en *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Inouye, M (Ed) Academic Press, págs. 83-117] mediante purificación en gel del fragmento de 0,5 kilopares de bases (kpb) obtenido de la escisión con *Sau 3A* y *Hind III*. El terminador ADH1 se aisló del vector pGAP.tADH2 [Kniskern, *et al.*, (1986), *Gene*, 46, págs. 135-141] por purificación en gel del fragmento de 0,35 kpb obtenido con la escisión con *Hind III* y *SpeI*. Los dos fragmentos se ligaron con DNA ligasa T4 al vector pUC18 Δ *Hind*

III purificado en gel (el sitio *Hind III* se eliminó por digestión de pUC18 con *Hind III*, generación de un extremo romo con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, y ligando con DNA ligasa T4) que se ha digerido con *BamHI* y *SphI* creando el vector parental pGall0-tADH1. Este tiene un único sitio de clonación *Hind III* en la unión Gall0p.ADH1.

El único sitio de clonación *Hind III* de pGall0.tADH1 se modificó a un único sitio de clonación *BamHI* por digestión de pGall0.tADH1 con *Hind III*, purificación en gel del DNA cortado y ligando, usando DNA ligasa T4 con el siguiente engarce de *Hind III-BamHI*:

5'-AGCTCGGATCCG-3'

3'-GCCTAGGCTCGA-5'

El plásmido resultante, pGall0(B)tADH1, tenía eliminado el sitio *Hind III* y generó un único sitio de clonación *BamHI*.

El fragmento Gall0p.tADH1 se aisló de pGall0(B)tADH1 por digestión con *SmaI* y *SphI*, se generó un extremo romo con DNA polimerasa T4 y se purificó en gel. El vector transportador de levadura pCI/I [Brake *et al.*, (1984), *Proc. nat'l. Acad. Sci. USA*, 81, págs. 4642-4646] se digirió con *SphI*, se hizo romo su extremo con DNA polimerasa T4 y se purificó. Este fragmento se ligó al vector con DNA ligasa T4. La mezcla de la reacción de ligación se usó entonces para transformar células HB101 en *E. coli*, para originar resistencia a ampicilina y los transformantes se rastrearon por hibridación hasta una única hebra del engarce *Hind III-BamHI* marcado con ³²P. La construcción del nuevo vector, pCI/I.Gall0p(B)ADH1, se confirmó por digestión con *Hind III* y *BamHI*.

Ejemplo 18

Construcción de un vector de expresión de MIEP de levadura con secuencias de DNA de MIEP y líder

Se generó un fragmento de DNA que contenía la región de codificación completa de MIEP por digestión de pUC19.MIEP n° 7 con *SpeI* y *EcoRI*, purificación en gel de DNA de MIEP y generación de extremos romos con DNA polimerasa T4.

El vector de expresión interna de levadura pCI/I.Gall0p(B)ADH1, se digirió con *Bam HI*, se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal de ternero, y se generaron extremos romos con DNA polimerasa T4. El DNA se purificó en gel para eliminar el vector sin cortar.

El fragmento con extremo romo de 1,1 kpb de MIEP se ligó al vector pCI/I.Gall0p(B)ADH1, con extremo romo y se usó la mezcla de reacción de ligación para transformar células DH5 en *E. coli* competentes para la resistencia a ampicilina. Los transformantes se rastrearon por hibridación con un oligonucleótido de DNA marcado con ³²P:

5'...AAGCTCGGATCCTAGTTGCAATG...3', que se diseñó como homólogo con las secuencias de solapamiento de la unión MIEP-vector. Se elaboraron preparaciones de DNA a partir de transformantes positivos a la hibridación y digirieron con *KpnI* y *SalI* para verificar que el fragmento MIEP estaba en la orientación correcta para la expresión a partir del promotor Gall0. La confirmación adicional de la construcción de DNA se obtuvo por secuenciación de didesoxi a partir del promotor Gall0 en la región de codificación de MIEP.

La expresión de MIEP por los transformantes se detectó por análisis de transferencia Western. El MIEP recombinante producido en los transformantes migró conjuntamente en los geles de poliácridamida con MIEP purificado a partir de vesículas de OMPC, y fue inmunológicamente reactivo con anticuerpos específicos para MIEP.

Ejemplo 19

Construcción del vector de expresión MIEP de levadura con una secuencia de DNA de MIEP con 5'-modificado

Se generó un oligonucleótido de DNA que contenía el sitio *Hind III*, un conductor no traducido conservado de 5' de levadura (NTL), un codón de inicio de metionina (ATG), los 89 primeros codones de MIEP natural (comenzando con Asp en la posición +20) y el sitio *KpnI* (en la posición +89) usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se realizó como se especifica por el fabricante (Perkin Elmer Cetus) usando el plásmido pUC19MIEP42 n° 7 como molde y los siguientes oligómeros de DNA como cebadores:

5' CTAAGCTTAACAAAATGGACGTTACCTTGTACGGTACAATT 3', y

5' ACGGTACCGAAGCCGCCTTTCAAG 3'.

A fin de separar la región 5' del clon MIEP, se digirió el plásmido pUC19MIEP42 n°7 con *KpnI* y *Hind III* y se purificó en gel de agarosa el fragmento vector de 3,4 kpb. El fragmento de PCR de 280 pb se digirió con *KpnI* y

HindIII, se purificó en gel de agarosa y se ligó con el fragmento vector de 3,4 kpb. Los transformantes de HB101 en *E. coli* (BRL) se rastrearon por hibridación de oligonucleótido de DNA y se analizó el DNA de los transformantes positivos por digestión con enzimas de restricción. A fin de asegurar que no se introducían mutaciones durante la etapa de PCR, se secuenció el DNA generado por PCR de 280 pb de los transformantes positivos. El plásmido resultante contenía un inserto *Hind III-EcoRI* que comprendía un NTL de levadura, codón ATG, y el marco de lectura abierta completo (ORF) de MIEP comenzando en el codón Asp (aminoácido +20).

Los vectores de expresión de MIEP de levadura se construyeron como sigue. Los vectores pGAL10/pCI/I y pGAP/pCI/I [Vlasuk, G.P., *et al.*, (1989), *J.B.C.*, 264, págs. 12,106-12,112] se digirieron con *BamHI*, se crearon extremos romos con el fragmento Klenow de DNA polimerasa I y desfosforilaron con fosfatasa alcalina intestinal de ternero. Estos vectores lineales se ligaron con el fragmento *HindIII-EcoRI* tratado con Klenow y purificado en gel descrito anteriormente, que contenía NTL de levadura, ATG y ORF de MIEP formando pGall0/pCI/I-MIEP y pGAP/pCI/I-MIEP.

Se transformó con el plásmido pGall0/pCI/I-MIEP la cepa U9 (gall0pgal4-) de *Saccharomyces cerevisiae*. Los clones recombinantes se aislaron y examinaron para la expresión de MIEP. Los clones se reprodujeron a 37°C con agitación en medio sintético (leu-) que contenía glucosa al 2% (p/v) hasta una O.D.₆₆₀ de aproximadamente 6,0. Se añadió entonces galactosa hasta el 2% (p/v) para inducir la expresión de MIEP a partir del promotor Gall0. Las células se desarrollaron durante 45 horas más después de la inducción de galactosa hasta una O.D.₆₆₀ de aproximadamente 9,0. Las células se recogieron a continuación por centrifugación. El sedimento de células se lavó con agua destilada y se congeló.

Transferencia Western para MIEP recombinante

A fin de determinar si la levadura expresaba MIEP, se realizó el análisis por transferencia Western. Se usaron geles Novex Laemmli en 10 a 15 pocillos de 1mm al doce por ciento. Las células de levadura se rompieron en H₂O usando esferas de vidrio (puede usarse dodecilsulfato sódico (SDS) durante el procedimiento de rotura al 2%). Los restos celulares se separaron por centrifugación durante 1 minuto a 10.000 x g.

El sobrenadante se mezcló con tampón de tratamiento de muestra, como se divulga para la purificación de MIEP en gel de poliacrilamida. Las muestras se trataron a 35 mA, usando OMPC como control de referencia, hasta que el marcador de tinte azul de bromofenol salió del gel.

Las proteínas se traspasaron a papel de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro usando un aparato de transferencia NOVEX. Después de la transferencia, se bloqueó el papel de nitrocelulosa con albúmina sérica bovina al 5% en solución salina tamponada con fosfato durante 1 hora, después de lo cual se añadieron 15 ml de una dilución 1:1000 de antisero anti-MIEP de conejo (generado por inmunización con MIEP purificada en gel usando procedimientos convencionales). Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, se añadieron 15 ml de IgG anti-conejo de cabra conjugada con fosfatasa alcalina 1:1000. Después de 2 horas de incubación, se desarrolló la transferencia usando FAST RED TR SALT (Sigma) y Naphthol-AS-MX fosphate (Sigma).

Ejemplo 20

Expresión bacteriana de MIEP recombinante

Se digirió plásmido pUC19-MIEP que contenía el inserto génico de MIEP de 1,3 kilopares de bases con endonucleasas de restricción *SpeI* y *vEcoRI*. Se aisló el fragmento de 1,1 kpb y se purificó en un gel de agarosa usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. El plásmido pTACSD, que contenía dos promotores TAC cistrón y un único sitio *ECORI*, se digirió con *EcoRI*. Se formaron extremos romos en el DNA de MIEP de 1,3 kpb y en el vector pTACSD, usando DNA polimerasa T4 (Boehringer Mannheim) conforme a las instrucciones del fabricante. El DNA de MIEP de 1,3 kpb con extremo romo se ligó en el vector con extremo romo usando DNA ligasa T4 (Boehringer Mannheim) conforme a las instrucciones del fabricante. El DNA ligado se usó para transformar la cepa DH5aIQMAX (BRL) en *E. coli* conforme a las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se cultivaron en placas de agar que contenían 25 µg de kamicina/ml y 50 µg de penicilina/ml, y se incubaron durante aproximadamente 15 horas a 37°C. Se marcó con ³²P un oligonucleótido de DNA con una secuencia homóloga con MIEP y se usó para rastrear filtros de nitrocelulosa que contenían colonias desnaturalizadas lisadas de las placas de transformantes usando técnicas convencionales de hibridación de DNA. Las colonias que fueron positivas por hibridación se cartografiaron usando endonucleasas de restricción para determinar la orientación del gen MIEP.

La expresión de MIEP por los transformantes se detectó por análisis de transferencia Western. El MIEP recombinante producido en los transformantes migró conjuntamente sobre geles de poliacrilamida con MIEP purificado a partir de vesículas de OMPC y fue inmunológicamente reactivo a los anticuerpos específicos para MIEP.

Ejemplo 21

Conjugación de Pn-Ps con MIEP de N. meningitidis

5 Las conjugaciones químicas se realizaron conforme al procedimiento descrito en la patente U.S. número 4.882.317.

Se mezclan 10 mg de MIEP en 3 ml de tampón borato 0,1M, pH 11,5, con 10 mg de sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético (EDTA, Sigma Chemicals) y 4 mg de ditiotreitól (Sigma Chemicals). La solución de proteína se inyecta con N₂. Se añaden 125 mg de N-acetilhomocisteíniolactona (Aldrich Chemicals) a la solución de MIEP,
 10 y se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se dializa entonces dos veces bajo N₂ frente a 2 l de tampón borato 0,1M, pH 9,5, que contenía EDTA 4 mM, durante 24 horas a temperatura ambiente. La proteína tiolada se ensaya entonces respecto al contenido de tiol por reactivo de Ellmans (Sigma Chemicals) y se determina la concentración de proteína por reactivo de Bradford (Pierce Chemicals). Para la conjugación de MIEP con Pn-Ps, se añade un exceso de 1,5 veces (peso/peso) de Pn-Ps bromoacetilado a la solución de MIEP y se ajusta el pH a 9-9,5 con
 15 NaOH 1N. La mezcla se deja incubar bajo nitrógeno durante 6 a 8 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reacción, se añaden a la mezcla 25 µl de N-acetilcisteamina (Chemicals Dynamics) y se deja reposar durante 18 horas bajo N₂ a temperatura ambiente. La solución de conjugado se acidifica a pH de 3 a 4 con HCl 1N y se realiza la centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos. Se carga 1 ml de líquido sobrenadante directamente en una columna FPLC Superose 6B (1,6 x 50 cm, Pharmacia) y el conjugado se eluye con PBS. El pico de volumen de huecos que
 20 contiene el conjugado polisacárido-proteína (Pn-Ps-MIEP), se agrupa. La solución de conjugado se filtra entonces a través de un filtro de 0,22 µm para esterilización.

Ejemplo 22

Demostración de la Inmunogenicidad de los conjugados de Pn-Ps-MIEP

Inmunizaciones: Se inmunizan ratones macho Balb/c (Charles River, Wilmington, MA) IP con Pn-Ps conjugado covalentemente con MIEP usando 2,5 µg de Pn-Ps en 0,5 ml de hidróxido de aluminio preformulado. Se inmunizan ratones de control con cantidades equivalentes de Pn-Ps en forma de Pn-Ps-CRM [Anderson, M.E. *et al.*, (1985), *J. Pediatrics*, 107, págs. 346-351] (2,5 µg de Pn-Ps/6,25 µg de CRM; 1/4 de la dosis humana), Pn-Ps-DT (2,5 µg de Pn-Ps/1,8 µg de DT; 1/10 de la dosis humana de suerte que se usan cantidades constantes de Pn-Ps) y Pn-Ps-OMPC (2,5 µg de Pn-Ps/35 µg de OMPC; 1/4 de la dosis humana).

Se inmunizan monos Rhesus lactantes, de 6-13,5 semanas, con conjugados de Pn-Ps-MIEP adsorbidos sobre hidróxido de aluminio. Cada mono recibe 0,25 ml de conjugado en dos sitios diferentes de inyección, para una dosis total de 0,5 ml. Los monos se inmunizan el día 0, el 28 y el 56 y se extraen muestras sanguíneas cada dos a cuatro semanas.

Se miden las respuestas de anticuerpos por ELISA, que distingue la clase y subclase de la respuesta de inmunoglobulina. También se usa RIA que cuantifica los anticuerpos anti-Pn-Ps totales para evaluar la respuesta de los monos.

Los conjugados de Pn-Ps-MIEP pueden generar una respuesta inmunitaria en ratones que consiste en anticuerpos IgG anti-Pn-Ps y una respuesta de memoria. Esto contrasta con Pn-Ps-CRM y Pn-Ps-DT que no alcanzan unos niveles de anticuerpos anti-Pn-Ps medibles. Así, MIEP funciona como proteína portadora inmunológica para Pn-Ps y es capaz de generar una respuesta de anticuerpos anti-Pn-Ps cuando se conjuga covalentemente a antígeno Pn-Ps. Por tanto, MIEP purificada es una proteína portadora inmunológica eficaz que reemplaza a la OMPC heterogénea en la construcción de vacunas conjugadas de polisacáridos bacterianos.

Ejemplo 23

Determinación cuantitativa del contenido en polisacárido C en las preparaciones de Pn-Ps

Se han desarrollado sistemas para la cuantificación de polisacárido C, en base a procedimientos de RMN, enzimáticos o cromatográficos. En el presente caso, se usó la separación cromatográfica de colina (un componente del C-Ps) de muestras de Pn-Ps hidrolizado y se comparó con estos otros procedimientos. La colina se separó en una columna de intercambio catiónico acoplada con detección de la conductividad suprimida.

Las muestras de Pn-Ps se hidrolizaron totalmente por tratamiento con ácido fluorhídrico al 36% durante 2 horas a 45-65°C, seguido por ácido trifluoracético 2M durante 16 horas a 100°C. Después de la hidrólisis, se inyectaron 200-300 µg de la muestra en un sistema de cromatografía Dionex BioLC, con una columna analítica Omnipac PCX-500 y columna de protección, una columna de retención de cationes Ion Pac CTC-1, un supresor CMMS-2 Micromembrane, regenerado con hidróxido de tetrabutilamonio 50 mM (10 ml/min) y el detector de conductividad en posición de 1 µSiemen de sensibilidad. La muestra eluyó isocráticamente usando HCl al 5%, acetonitrilo al 5-20%, agua MiliQ al 85%, ácido diaminopropiónico 20 mM al 5%. La colina eluyó en forma de pico pronunciado después de aproximadamente 10 minutos.

ES 2 121 820 T5

Se analizó el contenido de colina en el C-Ps purificado (obtenido del Statens Serum Institut) usando este procedimiento y se obtuvo un valor de 5,4% de colina en peso. Este valor coincide con el publicado para el contenido en colina de C-Ps.

Se usó este factor para calcular la concentración de C-Ps en diversas muestras de preparaciones de Pn-Ps convirtiendo las cantidades nanomolares de colina obtenidas por HPLC en valores máxicos. Usando la conversión del 5,4% de colina en peso, se calculó la masa de C-Ps en peso. Las muestras con concentraciones de C-Ps superiores al 3% se rechazaron por inaceptables para la conjugación. La siguiente tabla muestra la correlación de este procedimiento con los procedimientos de RMN y enzimáticos, y muestra los niveles típicos de contaminación por C-Ps en preparaciones de Pn-Ps con diversos grados de pureza:

Muestra	RMN	ENZIMÁTICO	HPLC
Pn6B-Ps	20%	N.D.	18,4%
Pn6B-Ps	1,6%	0,3-1,0%	1,2%
Pn23F-Ps	N.D.	2,8%	3,7%
Pn14-Ps	2,9%	2,4%	3,2%
Pn19F-Ps	2,7%	2,6%	2,6%

Ejemplo 24

Preparación de Pn18C-Ps purificado y parcialmente hidrolizado

- Hidrólisis sónica:** Se solubilizó una porción de 3,0 g de Pn18C-Ps en polvo en 1.200 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 3-4 horas y luego se cubrió y almacenó a 4°C durante la noche. A continuación, la solución se sometió a tratamiento sónico en un vaso de precipitados de plástico en un baño de hielo con un Sonicador Branson (sonda de media pulgada, posición 8) durante intervalos de 20 minutos (en sacudidas de 5 minutos) hasta un total de 40 minutos. Se comprobó la viscosidad después de cada intervalo. Después de 40 minutos, se realizó otro tratamiento sónico de 10 minutos para obtener una viscosidad final de 1,218 centistokes. La muestra hidrolizada (volumen de 1188 ml) se llevó a temperatura ambiente y se añadió acetato sódico (59,2 g) hasta una concentración final del 3% (p/v).
- Sonda serológica:** Una sonda de fraccionamiento en isopropanol (IPA) y ensayo de Nefelosa con punto final dirigido por anticuerpos, realizada en una porción de 10 ml de la muestra, mostró que el Pn18C-Ps precipitaría entre el 40-50% de IPA.
- Primera adición de IPA:** la muestra hidrolizada [volumen = 1200 ml, de la etapa 1 anterior] se llevó hasta un 42,79% de IPA mediante la adición de 894 ml de IPA (añadidos gota a gota con agitación a temperatura ambiente). La muestra se dejó agitar durante 15-30 minutos y luego se centrifugó a 11.000 x g durante 30 minutos (rotor Beckman JA-10, 8.000 rpm; 20°C). El sedimento residual se trituró con EtOH absoluto en un frasco Omnimix de 250 ml, luego se recogió en un embudo de vidrio sinterizado de 60 ml. El precipitado se lavó directamente en el embudo con EtOH absoluto, luego con acetona y se secó a vacío sobre CaSO₄ (Drierita) a temperatura ambiente en preparación para análisis.
- Segunda adición de IPA y recuperación del producto intermedio:** El líquido sobrenadante con IPA al 42,7% [volumen = 2016 ml, de la etapa 3 anterior] se llevó hasta IPA al 45,2% añadiendo 92,0 ml de IPA gota a gota mientras se agitaba a temperatura ambiente. La muestra se maduró y centrifugó como en la etapa 3 anterior. El sedimento se trituró, recogió, lavó y secó como en la etapa 3 anterior. El producto intermedio Pn18C-Ps pesó 1,609 mg.
- Diálisis y liofilización:** Se solubilizó una porción (1612,5 mg) de muestra de la Etapa 4 anterior en 645 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. La solución (2,5 mg/ml) se traspasó a un tubo de diálisis (separación de PM 12.000; 45 mm) y se dializó frente a agua destilada a 4°C durante 30 horas con 2 cambios adicionales de agua destilada. A continuación se traspasó la muestra a matraces de liofilización, se congeló girando en un baño de hielo seco:metanol y liofilizó en un liofilizador Virtis (Freezemobile) durante 2-3 días. La recuperación de Ps producto final fue de 1487 mg.

Ejemplo 25

Conjugado de 18C de S. Pneumoniae-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC

- 5 A. *Preparación de resina Dowex 50x2 (tamiz malla 200-400) en tetrabutilamonio [Dowex 50 (Bu_4N^+)]:* Se suspendió la forma protonada de Dowex 50x2 (tamiz malla 200- 400) (500 g) en agua, se cargó en una columna y se lavó secuencialmente con 1] 600 ml de agua; 2] 1000 ml de HCl 6N; 3] 400 ml de agua hasta que el efluente fue neutro al papel pH; 4] 72 g de una solución acuosa al 10% de hidróxido de tetrabutilamonio hasta que el efluente fue fuertemente alcalino al papel pH; 5] 1000 ml de agua hasta neutralidad.
- 10 B. *Preparación de la forma en tetrabutilamonio del polisacárido tipo 18C de S. Pneumoniae [Pn18C(Bu_4N^+)]:* Se lavó una columna de 60 ml de Dowex 50x2 (Bu_4N^+) con 250 ml de agua. Se cubrió el polisacárido Pn18C (peso molecular reducido (650 mg)) con 65 ml de agua y se agitó durante 1 hora, momento en el cual parecía estar solubilizado. Esta solución se cargó en la columna y se dejó percolar por gravedad (durante 2 horas y luego a vacío durante 1 hora).
- 15 La columna se lavó con 150 ml de agua y los efluentes combinados se liofilizaron proporcionando 655 mg de la sal de 18C (Bu_4N^+). Se separaron veinticinco mg para el análisis por RMN y material retenido.
- C. *Preparación del derivado de 1,4-butanodiamina de 18C (18C- BuA_2):* Se cubrió 18C (Bu_4N^+) (630 mg) con 143 ml de DMSO (sulfóxido de dimetilo) y se agitó durante 3,25 horas. En este momento, todo el sólido estaba disuelto y se separó 1 ml para determinar el contenido en agua por valoración de Karl Fischer. Se encontró un valor de 28,2 μmoles de $\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$ (4 mmol en total). A esta solución, se añadieron 165,1 mg de carbonil diimidazol (CDI) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2,0 horas. Se preparó una solución que contenía 1,260 g de diclorhidrato de 1,4-butanodiamina (BuA_2HCl) en 40 ml de agua y se ajustó su pH a 10,20 con NaOH 2,5N. Esta solución se enfrió en un baño de hielo. La solución de DMSO madurada se añadió lentamente a la solución de BuA_2 fría y se agitó 10 minutos más en el baño de hielo. Se agitó entonces a temperatura ambiente durante 50 minutos, después de lo cual, se cargó la solución en un tubo de diálisis SPECTRAPOR 2, recortado a 1,27 cm de la parte superior del líquido y se dializó como sigue frente a: 1] 15 l de tampón NaPO_4 0,1M, pH 7,0 durante 13,0 horas; 2] 15 l de tampón NaPO_4 0,01M, pH 7,0 durante 11 horas; 3] 15 l de tampón NaPO_4 0,01M, pH 7,0 durante 10,8 horas; 4] 15 l de agua durante 9,5 horas. El volumen en este punto fue de 190 ml. Se extrajo una alícuota de 7,5 ml y liofilizó por separado para el ensayo por RMN. Los 182,5 ml restantes se liofilizaron hasta 416 mg de derivado de 1,4-butanodiamina de 18C (Pn18C- BuA_2). Un espectro de RMN de aproximadamente 5 mg mostró una “carga” de 10 restos butanodiamina por 100 unidades monómeras de polisacárido definidas comparando las integrales de las resonancias de los metilenos internos de butanodiamina y de los metilos de ramnosa (de 18C).
- 30 D. *Preparación del derivado de butanodiamina bromoacetilado de 18C (Pn18C- BuA_2 -BrAc):* Se cubrió 18C- BuA_2 (416 mg) con 36 ml de un tampón 0,1M, pH 9,04 (borato-fosfato de Kolthoff) y se agitó para solubilizar. A continuación, se añadieron 256 mg de bromoacetato de p-nitrofenilo en 4,48 ml de acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 20 horas a 4°C. Se dializó entonces en tubos SPECTRAPOR 2 como sigue: 1] frente a 15 l de agua durante 6 horas; 2] frente a 15 l de agua durante 6 horas; 3] frente a 15 l de agua durante 6 horas. En este punto, había un volumen de 60 ml del cual se extrajeron 1,7 ml para ensayos (RMN, Ouchterlony y Viscotek) y luego se añadieron 2,42 g de sal de tampón fosfato, pH 8 seca (preparada por liofilización de una solución de NaPO_4 0,1M, pH 8). Después de disolver, se filtró a través de un filtro CORNING 0,2 μm proporcionando una solución acuosa a pH 8 de 18C- BuA_2 -BrAc. La filtración fue lenta y requirió 4 filtros de copa.
- 35 E. *Conjugación de OMPC (N. meningitidis) con Pn18C- BuA_2 -BrAc:* Se cargó Complejo de la Proteína de Membrana Externa (N. meningitidis, OMPC 3,2 mg/ml, 80 ml) en cuatro tubos de centrifuga de 25 ml y se centrifugó en un rotor Ti 60 a 43.000 rpm (43 K), a 4°C durante 2 horas. Se preparó una mezcla de tiolación disolviendo 680 mg de EDTA (sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético) y 120 mg de ditiotreitól (DTT) en 40 ml de un tampón $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ a pH 11,09. Se añadieron 320 mg de N-acetilhomocisteinátolactona y a continuación se filtró la solución a través de un filtro Corning de 0,2 μm (tipo copa). Los sedimentos de la centrifugación anterior se desalojaron con 5 ml de la mezcla de tiolación filtrada (20 ml en total) y se traspasaron a un homogeneizador Dounce y se resuspendieron. Los tubos se enjuagaron por transferencia en serie de una solución de tiolación adicional de 2/10 ml. Las soluciones combinadas se homogeneizaron en el Dounce y el material resuspendido total (40 ml) se traspasó a un matraz de fondo redondo de 100 ml. El recipiente de vidrio se enjuagó con 20 ml adicionales de la solución de tiolación y se añadió al matraz de reacción. Después de cerrar herméticamente el matraz con un septo y reemplazar el aire por N_2 usando una válvula FIRESTONE, se maduró la mezcla de reacción durante 18,5 horas. Los 60 ml se dividieron entonces en cuatro tubos de centrifuga, rellenándose cada uno con KH_2PO_4 1M (acuoso) y se centrifugaron durante 2 horas a 43K y 4°C. Los sobrenadantes se separaron y se resuspendieron los sedimentos en tampón NaPO_4 0,1M, pH 8 (el volumen total de resuspensión final fue de 40 ml). Esta solución se traspasó por igual a dos tubos de centrifuga de 25 ml (policarbonato) y los útiles de vidrio (DOUNCE etc) se enjuagaron con aproximadamente 10 ml de tampón fosfato pH 8 y se usaron para rellenar los tubos de centrifuga. Se efectuó entonces una segunda ultracentrifugación (2 horas, 4°C, 43K). Los sedimentos se resuspendieron en 30 ml de tampón PO_4 0,1M, pH 8. Un ensayo de Ellman indicó un total de 24 micromoles de SH o aproximadamente 100 nanomoles/mg de OMPC. La proteína tiolada se traspasó a un matraz de fondo redondo de 100 ml y se añadió al mismo la solución de 18C- BuA_2 -BrAc filtrada. La reacción resultante (es decir, 18C- BuA_2 -BrAc con OMPC tiolada) se maduró bajo N_2 (con desgasificación) en un recipiente de N_2 a temperatura ambiente durante 89 horas.

ES 2 121 820 T5

La reacción de formación del casquete entonces fue como sigue: Se filtró una solución que contenía 75 mg de N-etilmaleimida (NEM) en 5 ml de tampón NaPO_4 0,1M, pH 8 a través de un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ y se añadieron 2 ml a la mezcla de reacción anterior y se maduró durante 4 horas.

A continuación, se filtraron 0,5 ml de N-acetilcisteamina en 2,5 ml de tampón PO_4 0,1 M, pH 8 a través de un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ y se añadieron 1,0 ml de esta solución a la reacción y se maduró durante 22,5 horas.

El producto con el casquete formado se cargó en cantidades iguales en cuatro tubos de centrífuga de 25 ml y se rellenaron con un total de 8 ml de tampón PO_4 0,1M, pH 8 y se centrifugaron a 43K, 2 horas y 4°C . Después de separar los sobrenadantes, se resuspendieron los sedimentos en un homogeneizador DOUNCE en un total de 40 ml de tampón TED, se enjuagaron los útiles de vidrio con 10 ml adicionales de tampón TED y se traspasó la solución a dos tubos de 25 ml. Estos tubos se almacenaron a temperatura ambiente durante 15,25 horas y seguidamente se centrifugaron durante 2 horas a 43K rpm y a 24°C . Los sedimentos resultantes se resuspendieron en un homogeneizador DOUNCE en un total de 30 ml de tampón TED, se traspasaron a dos tubos de centrífuga de 25 ml, se enjuagaron los útiles de vidrio con 20 ml adicionales de tampón TED y se recentrifugaron a 43K, 4°C durante 2 horas. Los sedimentos se resuspendieron en 50 ml de tampón fosfato a pH 7 y sometieron a una tercera centrifugación a 43K durante 2 horas a 4°C . Los sedimentos se resuspendieron en 82 ml de agua y se traspasaron a dos tubos de centrífuga (FALCON) estériles de plástico de 50 ml en porciones de 20,5 ml. Después de madurar a 4°C durante 18 horas, la preparación de conjugado se centrifugó a 1000 rpm durante 3,5 minutos en un rotor TH en una centrífuga TJ-6. La suspensión de conjugado de producto final se ensayó para determinar proteína (Lowry), polisacárido 18C (fenol/ácido sulfúrico), polisacárido no conjugado (cromatografía de exclusión molecular-nefelometría diferencial) y aminoácidos (SPINCO):

Polisacáridos: 339 microgramos/ml;

Proteínas=2,57 mg/ml;

Polisacárido libre: < 5% (límite de error del ensayo)

S-carboximetilhomocisteína/lisina=0,025;

S-carboximetilcisteamina/lisina=0,005.

Ejemplo 26

Preparación del Intermedio Pn4-Ps

- (1) Hidrólisis sónica: Se solubilizó una porción de 1,0 g de Pn4-Ps en polvo en 400 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas. A continuación, la solución se sometió a tratamiento sónico en un vaso de precipitados de plástico en un baño de hielo con un Sonicador Branson (sonda de media pulgada, posición 8) durante intervalos de 10 minutos hasta un total de 20 minutos. Se comprobó la viscosidad después de cada intervalo. Después de 20 minutos, se obtuvo una viscosidad final de 1,267 centistokes. La muestra hidrolizada se llevó a temperatura ambiente y se añadió acetato sódico (18,7 g) hasta una concentración final del 3% (p/v).
- (2) Sonda serológica: Un estudio piloto de fraccionamiento en isopropanol (IPA) y ensayo de Nefelosa con punto final dirigido por anticuerpos, realizado en una porción de 10 ml de la muestra, mostró que el Pn4-Ps precipitaría entre el 45-55% de IPA.
- (3) Primera adición de IPA: La muestra hidrolizada [volumen = 385 ml, de la etapa 1 anterior] se llevó hasta un 49,7% de IPA mediante la adición de 379 ml de IPA (añadidos gota a gota con agitación a temperatura ambiente). La muestra se dejó agitar durante 15-30 minutos y luego se centrifugó a $11.000 \times g$ durante 30 minutos (rotor Beckman JA-10, 8.000 rpm; 20°C). El sedimento residual se trituró con EtOH absoluto en un frasco Omnimix de 250 ml, luego se recogió en un embudo de vidrio sinterizado de 60 ml. El precipitado se lavó directamente en el embudo con EtOH absoluto, luego con acetona y se secó a vacío sobre CaCl_2 a temperatura ambiente en preparación para análisis.
- (4) Segunda adición de IPA y recuperación del producto intermedio: El líquido sobrenadante con IPA al 49,7% [volumen=727 ml, de la etapa 3 anterior] se llevó hasta IPA al 52,2% añadiendo 38 ml de IPA gota a gota mientras se agitaba a temperatura ambiente. La muestra se maduró y centrifugó como en la etapa 3 anterior. El sedimento se trituró, recogió, lavó y secó como en la etapa 3 anterior. El producto intermedio Pn4-Ps pesó 516 mg.
- (5) Diálisis y liofilización: Se solubilizó una porción (500 mg) de muestra de Pn-Ps de la Etapa 4 anterior en 200 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante 2-3 horas. La solución (2,5 mg/ml) se traspasó a un tubo de diálisis (separación de PM 12.000; 45 mm) y se dializó frente a agua destilada a 4°C durante 27 horas con 2 cambios adicionales de agua destilada. A continuación se traspasó la muestra a matraces de liofilización, se congeló girando en un baño de hielo seco:metanol y liofilizó en un liofilizador Virtis (Freezemobile) durante 2-3 días. La recuperación de Ps producto final fue de 491 mg. El producto final tenía un Kd de 0,69.

De esta divulgación, es evidente para los expertos en la técnica que podrían prepararse otros subtipos de Pn-Ps que contienen carboxilo como Pn1-Ps o Pn5-Ps, conforme al procedimiento aquí descrito y conjugar como para el caso de Pn4-Ps o Pn9V-Ps, que también son polisacáridos ácidos.

5 Ejemplo 27

Conjugado de OMPC Tipo 4 de S.Pneumoniae-OMPC, Pn4-Ps-OMPC

10 A. Preparación de resina Dowex 50x2 (tamiz malla 200-400) en tetrabutilamonio [Dowex 50 (Bu_4N^+)]: Se suspendió la forma protonada de Dowex 50x2 (tamiz malla 200- 400) (500 g) en agua (CM-66), se cargó en una columna y se lavó secuencialmente con 1] 600 ml de agua; 2] 1000 ml de HCl 6N; 3] 400 ml de agua hasta que el efluente fue neutro al papel pH; 4] 72 g de una solución acuosa al 10% de hidróxido de tetrabutilamonio hasta que el efluente fue fuertemente alcalino al papel pH; 5] 1000 ml de agua hasta neutralidad.

15 B. Preparación de la forma en tetrabutilamonio del polisacárido tipo 4 de *S. Pneumoniae* [Pn4(Bu_4N^+): Se lavó una columna de 65 ml de Dowex 50x2 (Bu_4N^+) con 250 ml de agua. Se cubrió el polisacárido Pn-4 (peso molecular reducido (400 mg)) con 35 ml de agua y se agitó durante 20 minutos, momento en el cual parecía estar solubilizado (la agitación continuó durante la noche). Esta solución se cargó en la columna y se dejó percolar por gravedad y la columna se lavó con 150 ml de agua y los efluentes combinados se liofilizaron proporcionando 504 mg de la sal Bu_4N^+ de Pn4.

20 C. Preparación del derivado de 1,4-butanodiamina de Pn4 (Pn4-BuA₂): Se cubrió Pn4 (Bu_4N^+) (97 mg) con 16 ml de DMSO (sulfóxido de dimetilo) y se agitó en la solución durante un período de 15 minutos a 52°C. En este momento, todos los sólidos estaban disueltos y la solución se enfrió a temperatura ambiente.

25 A esta solución, se añadieron 2 mg de carbonil diimidazol (CDI) disueltos en 160 μl de DMSO y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,0 hora. Se preparó una solución que contenía 0,500 g de diclorhidrato de 1,4-butanodiamina (BuA_2HCl) en 5 ml de agua y se ajustó su pH a 10,20 con NaOH 5N. Esta solución se enfrió en un baño de hielo. La solución de DMSO madurada se añadió lentamente a la solución de BuA₂ fría y se agitó 30 10 minutos más en el baño de hielo. Se agitó entonces a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual, se cargó la solución en tubos de diálisis SPECTRAPOR 2, recortados a 1,27 cm de la parte superior del líquido y se dializó como sigue frente a: 1] 4 l de tampón NaPO_4 0,1M, pH 7,0 durante 15,0 horas; 2] 4 l de tampón NaPO_4 0,01M, pH 7,0 durante 9 horas; 3] 4 l de tampón NaPO_4 0,01M, pH 7,0 durante 21 horas; 4] 4 l de agua durante 20 horas. La solución se liofilizó hasta 70 mg de derivado de 1,4-butano diamina de Pn4 (Pn4-BuA₂). Un espectro de RMN de 35 aproximadamente 5 mg mostró una “carga” de 22 restos butanodiamina por 100 unidades monómeras repetitivas de polisacárido definidas comparando las integrales de las resonancias de los metilenos internos de butanodiamina y de los metilos de N-acetilo (de Pn4).

40 D. Preparación del derivado de butanodiamina bromoacetilado de Pn4 (Pn4-BuA₂-BrAc): Se cubrió Pn4-BuA₂ (54 mg) con 5,5 ml de un tampón 0,1 M, pH 9,04 (borato-fosfato de Kolthoff) y se agitó para solubilizar. A continuación, se añadieron 55 mg de bromoacetato de p-nitrofenilo en 1,0 ml de acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó durante 17 horas a 4°C. Se dializó entonces en tubos SPECTRAPOR 2 como sigue: 1] frente a 16 l de agua durante 24 horas; 2] frente a 16 l de agua durante 8 horas; 3] frente a 16 l de agua durante 23 horas. En este punto, había un volumen de 12,5 ml del cual se extrajo 1,0 ml para ensayos (RMN, Ouchterlony y Viscotek) y luego se añadieron 275 mg de sal de 45 tampón fosfato, pH 8 seca (preparada por liofilización de una solución de NaPO_4 0,1M, pH 8). Después de disolver, se filtró a través de un filtro CORNING 0,2 μm proporcionando una solución acuosa a pH 8 de Pn4-BuA₂-BrAc.

50 E. Conjugación de OMPC (*N. meningitidis*) con Pn4-BuA₂-BrAc: Se centrifugó Complejo de la Proteína de Membrana Externa (*N. meningitidis*, OMPC 4,34 mg/ml), (5 ml) en un rotor 80 Ti a 43.000 rpm (43 K), a 4°C durante 2 horas. Se preparó una mezcla de tiolación disolviendo 85 mg de EDTA (sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético) y 15 mg de ditiotreitól (DTT) en 10 ml de un tampón $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ a pH 11,09. Se añadieron 50 mg de N-acetilhomocisteína tiolactona y a continuación se filtró la solución a través de un filtro de 0,2 μm . Los sedimentos de la centrifugación anterior se desalojaron con 5 ml de la mezcla de tiolación filtrada y se traspasaron a un homogeneizador Dounce y se resuspendieron. La solución resuspendida se traspasó a un tubo de centrifuga, se cubrió con un septo 55 y se reemplazó el aire por N_2 usando una válvula FIRESTONE. La mezcla de reacción se maduró durante 19 horas y luego se traspasó a un tubo de centrifuga que se rellenó con KH_2PO_4 1M (acuoso) y luego se centrifugó durante 2 horas a 43K y 4°C. Los sobrenadantes se separaron y los sedimentos se resuspendieron en tampón NaPO_4 0,1M, pH 8. Esta solución se traspasó a un tubo de centrifuga y se efectuó entonces una segunda ultracentrifugación (2 horas, 4°C, 43K). Los sedimentos se resuspendieron en 11,5 ml solución de Pn4-BuA₂-BrAc preparada en la sección D. Un 60 ensayo de Ellman indicó un total de 3,44 micromoles de SH o aproximadamente 158 nanomoles de SH/mg de OMPC. La reacción resultante (es decir, Pn4-BuA₂-BrAc con OMPC tiolada) se maduró bajo N_2 (con desgasificación) en un recipiente de N_2 a temperatura ambiente durante 66 horas.

65 La reacción de formación del casquete entonces fue como sigue: Se filtró una solución que contenía 5 mg de N-etilmaleimida (NEM) en 1 ml de tampón NaPO_4 0,1 M, pH 8, en un filtro de 0,22 μm y se añadió a la mezcla de reacción anterior se maduró durante 5 horas. A continuación, se filtraron 0,1 ml de N-acetilcisteamina en 0,4 ml de tampón PO_4 0,1M, pH 8, a través de un filtro de 0,22 μm y se añadió esta solución a la reacción y se maduró durante 14,5 horas.

ES 2 121 820 T5

La mezcla de reacción se centrifugó entonces a 43K, 4°C durante 2 horas y se resuspendió el sedimento en 8 ml de tampón TED 1X. Esta solución se maduró a temperatura ambiente durante la noche y se centrifugó a continuación a 43K, 4°C durante 2 horas. El sedimento se resuspendió en 8 ml de tampón TED y se volvió a centrifugar inmediatamente durante 2 horas a 43K y 4°C. El sedimento se resuspendió entonces en 10 ml de tampón PO_4 0,1M, pH 7,0 y se volvió a centrifugar a 43K, 4°C durante 2 horas. Este sedimento final se resuspendió en 7,5 ml de agua. Después de madurar durante la noche a 4°C, se centrifugó la suspensión a 1.000 rpm durante 3 minutos y se separó el sobrenadante como conjugado final.

Ensayos

Proteínas Lowry: 0,920 mg/ml;

Ensayo de ácido sulfúrico/fenol: 0,212 mg/ml;

Ps/Pro=0,23;

SCMHC/Iys=0,031;

SCMC/Iys=0,022.

Tras la administración de este conjugado a ratones o Monos Verdes Africanos, se consiguieron elevadas concentraciones de anticuerpos anti-Pn-Ps, como se midió por un ensayo ELISA específico para Pn4-Ps.

Ejemplo 28

Preparación del Intermedio Pn9V-Ps

(1) Hidrólisis sónica: Se solubilizó una porción de 1,0 g de Pn9V-Ps en polvo en 400 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas. La solución se sometió a tratamiento sónico a continuación en un vaso de precipitados de plástico en un baño de hielo con un Sonicador Branson (sonda de media pulgada, posición 8) durante un intervalo de 3 minutos. Se comprobó la viscosidad después de este intervalo. Después de 13 minutos, se efectuó otro tratamiento sónico de 1 minuto para obtener una viscosidad final de 1,117 centistokes. La muestra hidrolizada se llevó a temperatura ambiente y se añadió acetato sódico (19,5 g) hasta una concentración final del 3% (p/v).

(2) Sonda serológica: Un estudio piloto de fraccionamiento en isopropanol (IPA) y ensayo de Nefelosa con punto final dirigido por anticuerpos, realizado en una porción de 10 ml de la muestra, mostró que el Pn9V-Ps precipitaría entre el 40-45% de IPA.

(3) Primera adición de IPA: La muestra hidrolizada [volumen = 391 ml, de la etapa 1 anterior] se llevó hasta un 41,8% de IPA mediante la adición de 281 ml de IPA (añadidos gota a gota con agitación a temperatura ambiente). La muestra se dejó agitar durante 15-30 minutos y luego se centrifugó a 11.000 x g durante 30 minutos (rotor Beckman JA-10, 8.000 rpm; 20°C). El sedimento residual se trituró con EtOH absoluto en un frasco Omnimix de 250 ml, luego se recogió en un embudo de vidrio sinterizado de 60 ml. El precipitado se lavó directamente en el embudo con EtOH absoluto, luego con acetona y se secó a vacío sobre CaCl_2 a temperatura ambiente en preparación para análisis.

(4) Segunda adición de IPA y recuperación de producto: El líquido sobrenadante con IPA al 41,8% [volumen=637 ml, de la etapa 3 anterior] se llevó hasta IPA al 44,3% añadiendo 28,6 ml de IPA gota a gota mientras se agitaba a temperatura ambiente. La muestra se maduró y centrifugó como en la etapa 3 anterior. El sedimento se trituró, recogió, lavó y secó como en la etapa 3 anterior. El Pn9V-Ps producto pesó 342,2 mg.

(5) Diálisis y liofilización: Se solubilizó una porción (347 mg) de muestra de Pn-Ps de la Etapa 4 anterior en 139 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante 4-5 horas. La solución (2,5 mg/ml) se traspasó a un tubo de diálisis (separación de PM 12.000; 45 mm) y se dializó frente a agua destilada a 4°C durante 25 horas con 2 cambios adicionales de agua destilada. A continuación se traspasó la muestra a matraces de liofilización, se congeló girando en un baño de hielo seco:metanol y se liofilizó en un liofilizador Virtis (Freezemobile) durante 2-3 días. La recuperación de Ps producto final fue de 303,5 mg. El producto final tenía un $K_d=0,60$.

(6) Tercera adición de IPA y recuperación del producto: El líquido sobrenadante con IPA al 44,3% [volumen=655 ml, de la etapa 4 anterior] se llevó hasta IPA al 46,8% añadiendo 30,8 ml de IPA gota a gota mientras se agitaba a temperatura ambiente. La muestra se maduró y centrifugó como en la etapa 3 anterior. El sedimento se trituró, recogió, lavó y secó como en la etapa 3 anterior. El Pn9V-Ps producto pesó 410,8 mg.

- (7) Diálisis y liofilización: Se solubilizó una porción (420,4 mg) de la muestra de Pn-Ps de la etapa 6 anterior en 168 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante 4-5 horas. La solución (2,5 mg/ml) se traspasó a un tubo de diálisis (separación de PM 12.000; 45 mm) y se dializó frente a agua destilada a 4°C durante 25 horas con dos cambios adicionales de agua destilada. A continuación, se traspasó la muestra a matraces de liofilización, se congeló girando en un baño de hielo seco:metanol y se liofilizó en un liofilizador Virtis (Freezmobile) durante 2-3 días. La recuperación del Ps producto final fue de 342,5 mg. El producto final tenía un $K_d=0,65$.
- (8) Es evidente para los expertos en la técnica que los productos de las etapas 4 y 6 podrían haberse recogido conjuntamente con una mayor adición de IPA, luego dializar y liofilizar como único producto con características analíticas resultado de la media ponderada de las características de las subfracciones individuales. También es evidente para los expertos en la técnica que podrían haberse tratado Pn1-Ps o Pn5-Ps de la misma forma que se ha descrito en la presente para Pn9V-o Pn4-Ps.

Ejemplo 29

Conjugación de Pn9V-Ps con OMPC

Se conjugó Pn9V-Ps preparado conforme al Ejemplo 28 de la misma forma que se ha mostrado en el Ejemplo 27 para Pn4-Ps.

Ejemplo 30

Determinación cuantitativa de acetato en Pn9V/18C-Ps y piruvato en Pn4-Ps

Se desarrolló un procedimiento para cuantificar la retención de grupos O-piruvato en Pn4-Ps y O-acetato en Pn9V-Ps y Pn18C-Ps durante el procesamiento de polisacáridos (Ps) capsulares neumocócicos (Pn). Los grupos O-acetilo y O-piruvato se liberan primero por hidrólisis, luego se identifican el acetato y piruvato en el hidrolizado de Pn-Ps y se cuantifican usando cromatografía de intercambio iónico de alta resolución acoplada a conductividad suprimida.

Muestras de Pn4, Pn9V y Pn18C procesados y no procesados se analizaron por este procedimiento. Los resultados previos mostraron una relación molar aproximada de 1:1 y 0,8:1 de piruvato por cada unidad repetitiva de Ps para el Pn4 no procesado y del tamaño especificado, respectivamente. Las relaciones molares de acetato por cada unidad repetitiva de Ps en Pn18C-Ps fueron 1:1 y 0,8:1 para las muestras no procesadas y del tamaño especificado, respectivamente; y de 1,7:1 y 1,5:1 para Pn9V no procesado y del tamaño especificado, respectivamente. Se analizó además una muestra de granel acuoso conjugado Pn18C-Ps-OMPC para determinar la relación molar de O-acetato por cada unidad repetitiva de Ps y se encontró que era aproximadamente de 0,5:1.

Se ha descrito en la bibliografía que el grupo piruvato es un inmunodeterminante potente en los polisacáridos capsulares tipo 4, y su retirada aporta cambios notables en la especificidad inmunológica [Heidelberger, M., Dudman, W.F., and Nimmich, W., "Immunochemical relationships of certain capsular polysaccharides of Klebsiella, pneumococci, and Rhizobia", *J. Immunol.*, 104:1321-1328, (1970); Higginbotham, J.D., Heidelberger, M., and Gotschlich, E., "Degradation of a pneumococcal type-specific polysaccharide with exposure of group-specificity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67:138-142, (1970)]. Igualmente, la retirada del grupo O-acetato en polisacárido tipo Pn18C-Ps eliminó su especificidad inmunológica [Estrada-Parra, S., and Heidelberger, M., "The specific polysaccharide of type XVIII pneumococcus", *Biochemistry*, 2:1288-1294, (1963)]. Por lo tanto, es fundamental desarrollar un procedimiento cuantitativo para determinar acetato y piruvato en Pn18C-Ps y Pn4. Los grupos O-acetilo en Pn9V pueden desempeñar una función importante en la estructura inmunológica de Pn9V dado que el Pn9V des-O-acetilado no posee reactividad antigénica como se ha determinado por mediciones de nefelometría diferencial.

Los inventores presentes han descubierto que el O-acetato se libera fácilmente de Pn9V y Pn18C-Ps en condiciones alcalinas (pH 11) a 4°C y el O-piruvato se libera fácilmente de Pn4 al calentar a 65°C. Los inventores presentes han descubierto que el acetato y piruvato pueden separarse de una muestra de Pn-Ps usando una columna OmniPac PAX500 a un caudal de 1 ml/min con NaOH 0,98mM y MeOH al 2% como fase móvil. La detección se realizó por detección de la conductividad suprimida usando H_2SO_4 25mM como regenerador a un caudal de 10 ml/min. Las condiciones de hidrólisis óptimas para el análisis por HPLC cuantitativo de O-acetato y O-piruvato a partir de Pn18C-Ps, 9V y Pn4, respectivamente, se divulgan en este ejemplo.

Instrumentación

Se equipó una Dionex BioLC con una columna de protección OmniPac PAX-500 y columna analítica (4,6 x 250 mm). La detección de conductividad suprimida se realizó usando ácido sulfúrico 25 mM como regenerador. El caudal se ajustó a 10 ml/min con una unidad autoregeneradora Dionex. La fase móvil y el programa de gradientes para la separación de acetato y piruvato de una muestra de Pn-Ps hidrolizado son como se resumen en la siguiente tabla:

ES 2 121 820 T5

Tampón 1	-	hidróxido sódico 1 mM
Tampón 2	-	metanol al 100%
Tampón 3	-	hidróxido sódico 200 mM
Tampón 4	-	agua

Tiempo	% de Tampón 1	% de Tampón 2	% de Tampón 3	% de Tampón 4	Caudal (ml/min)
0	98	2	0	0	1
12,5	98	2	0	0	1
12,6	58	2	0	40	1,5
20,0	58	2	0	40	1,5
20,1	98	2	0	0	1,5
30,0	98	2	0	0	1,5
30,1	98	2	0	0	1
50,0	98	2	0	0	1

Usando estas condiciones y una sensibilidad del detector de $3\mu\text{Siemens}$, se pueden detectar fácilmente 4 nanomoles de acetato y piruvato que eluyeron a tiempos de retención de aproximadamente 5,2 y 9,5 minutos, respectivamente.

Preparación de la muestra

Muestras de Pn-Ps purificado de Merck Manufacturing Division se sometieron a valoración de Karl-Fisher usando un valorador de humedad volumétrico Aquastar V3000 para determinar el contenido de agua residual, y luego se disolvieron en agua Milli-Q a una concentración de 1,0 mg de peso seco por ml. Se trataron muestras (100 $\mu\text{g/ml}$) en NaOH 2 mM durante 16 horas a temperatura ambiente para eliminar el O-acetato de las muestras de Pn9V-Ps y Pn18C-Ps. Las muestras de Pn4-Ps se hidrolizaron en HCl 1mM a 65°C durante 16 horas para eliminar el O-piruvato de Pn4. Las muestras de Pn9V y Pn18C-Ps del tamaño especificado y de granel acuoso de conjugado Pn18C-Ps-OMPC también se sometieron a análisis de composición de monosacáridos por cromatografía de intercambio iónico a pH elevado y detección amperimétrica de impulsos. El análisis de composición de monosacáridos se realizó a fin de obtener la concentración correcta de Pn-Ps en las muestras del tamaño especificado y a granel del conjugado acuoso.

Se disolvieron en agua Milli-Q a una concentración de 200 nmoles/ml patrones de acetato, piruvato y N-acetilmanosamina.

Hidrólisis de muestras y patrones

La des-O-acetilación de Pn18C-Ps se investigó tratando Pn18C-Ps a cuatro concentraciones de NaOH (1, 2, 5 y 50 mM) a diversas temperaturas (4, 25, 45 y 65°C) y diferentes tiempos (3, 5 y 16 horas). Soluciones patrón de acetato, piruvato y N-acetilmanosamina también se incluyeron en el estudio a fin de determinar si las condiciones necesarias para la des-O-acetilación originarían también la degradación de acetato/piruvato o la pérdida de los grupos N-acetilo.

La eliminación de piruvato de Pn4 se estudió después del tratamiento con hidróxido de sodio (50 mM/100°C/16 horas) o ácido clorhídrico a diferentes concentraciones (1, 10, 100 mM), tiempos (3, 5 y 16 horas) y temperaturas (65, 86 y 100°C).

Nefelometría diferencial

Se midió la actividad nefelométrica diferencial de Pn9V-Ps, Pn18C-Ps y Pn4-Ps antes y después de la des-O-acetilación o des-O-piruvilación. Las muestras se diluyeron a 1, 1,5, 2 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

Cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (HPSEC)

Se midió la HPSEC de Pn9V-Ps, Pn18C-Ps y Pn4 antes y después de la des-O-acetilación o des-O-piruvilación. Se calentó a 50°C y 5,5 MPa-6,9 MPa una columna de 7,5 x 600 mm TSK G6000PW, equipada con un limitador de caudal, y se equilibró con acetato sódico 0,2M a 0,3 ml/min. Se inyectó una muestra de 60 µg (1 mg/ml) en la columna y eluyó con la fase móvil a 0,3 ml/min. El eluyente de la columna se mezcló con una adición posterior a la columna de NaOH 0,5M a un caudal de 0,5 ml/min y se controló con un detector amperimétrico de impulsos Dionex, midiendo el K_d .

Sensibilidad y linealidad del ensayo

Se determinaron la sensibilidad y la linealidad del detector a 3 µ Siemens para piruvato y acetato. Piruvato y acetato fueron detectables a un límite inferior de 0,125 nanomoles. La respuesta del detector para ambos componentes fue lineal durante 2 nanomoles con coeficientes de correlación de 0,9999 y 0,9992 para piruvato y acetato, respectivamente.

Optimización de la eliminación de O-acetato a partir de Pn18C-Ps

Estudios previos de la hidrólisis de Pn18C-Ps en el tiempo demostraron el carácter lábil del grupo O-acetilo a la hidrólisis alcalina a bajas temperaturas. Hidróxido sódico 2 mM era suficiente para des-O-acilar completamente Pn18C-Ps a 4°C después de una incubación de 16 horas. En tratamientos a temperaturas más altas (>25°C) se encontró una liberación de N-acetato de N-acetilmanosamina que podría interferir en la medida del O-acetato de Pn9V. Las condiciones de hidrólisis óptimas para la eliminación de O-acetato de Pn-Ps se encontraron en 16 horas a 4°C. Se descubrió que menos del 1% de acetato era eliminado de un patrón de N-acetilmanosamina tratado con NaOH 2mM durante 16 horas a temperatura ambiente.

Optimización de la eliminación de O-piruvato de Pn4

Se realizaron inicialmente estudios de hidrólisis de Pn4 usando hidrólisis con hidróxido sódico. Se descubrió rápidamente que se recuperaba muy poco piruvato cuando se usaba hidróxido sódico. Estudios de control iniciales demostraron que el piruvato se separaba del Pn4 a 100°C en agua. Con esta información, se decidió llevar a cabo los estudios de optimización para la liberación de O-piruvato de Pn4 usando hidrólisis con HCl a temperaturas elevadas. A temperaturas más altas, apareció cierta degradación de piruvato. Esto se puede demostrar con una muestra de patrón piruvato que se haya hidrolizado en las mismas condiciones que Pn4. La recuperación máxima de piruvato se produjo cuando se llevó a cabo la hidrólisis en HCl 1 mM durante 16 horas a 65°C.

Análisis de O-acetato y O-piruvato en muestras de Pn-Ps

Se analizaron diversas muestras que representaban Pn-Ps de partida, Pn-Ps del tamaño especificado y un conjugado Pn18C-Ps-OMPC para determinar O-acetato/piruvato por el procedimiento HPLC descrito anteriormente después de la hidrólisis en NaOH 2 mM a temperatura ambiente para liberar O-acetato en Pn9V-Ps/18C o en HCl 1 mM a 65°C para liberar O-piruvato en Pn4-Ps. Los resultados de este estudio se presentan a continuación.

Muestra	Relación entre piruvato/acetato y cada unidad de Ps repetitiva
Pn4, muestra 1	1,0
Pn4, muestra 2	0,8
Pn9V, muestra 1	1,7
Pn9V, muestra 2	1,5
Pn18C-Ps, muestra 1	1,0
Pn18C-Ps, muestra 2	0,8
Pn18C-Ps-OMPC acuoso a granel	0,5

Los resultados muestran que la retención de los grupos laterales en el Pn-Ps del tamaño especificado fue aproximadamente del 90% para Pn9V-Ps y del 80% para Pn4 y 18C. La retención de O-acetato en el conjugado acuoso a granel Pn18C-Ps-OMPC fue aproximadamente del 50%. Los valores teóricos para Pn 18C-Ps y Pn4 son 1 mol de acetato o piruvato por mol de unidad de Ps repetitiva y para Pn9V, la relación es de 2:1 [Jansson, P.E., Lindberg, B., and Lindquist, U. "Structural studies of the capsular polysaccharides from *Streptococcus pneumoniae* Type 4" *Carbohydr. Res.*, **95**:73-80 (1981). Lugrowski, C. and Jennings, H.J. "Structural determination of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 18C", *Carbohydr. Res.*, **131**:119-129, (1984). Perry, M.B., Daoust, V., and Carlos, D.J. "The specific capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 9V", *Can. J. Biochem.*, **59**:524-533, (1981)]. La menor retención de O-acetato encontrada en el conjugado Pn 18C-Ps-OMPC es la esperada debido a la susceptibilidad de la hidrólisis de grupos O-acetilo a condiciones alcalinas a bajas temperaturas.

Se midió la actividad nefelométrica diferencial de muestras de Pn4, Pn9V y Pn 18C-Ps y de muestras des-O-piruviladas y des-O-acetiladas. Los resultados muestran que la actividad de nefelosa se perdió totalmente después de la retirada de estos grupos laterales, considerando incluso el Kd de las muestras no tratadas. Los Kd se obtuvieron por el procedimiento HPSEC descrito anteriormente. Sin embargo, el Kd de Pn4 después de la des-O-piruvilación por hidrólisis ácida débil aumentó de 0,60 a 0,68 y apareció cerca del volumen de sal. El valor de antigenicidad de Pn4 y Pn18C-Ps apoya el trabajo de otros investigadores respecto a la importancia de estos grupos laterales en la reactividad inmunológica de polisacáridos neumocócicos. Los resultados para Pn9V sugieren que, además del ácido glucurónico, los grupos O-acetilo de esta molécula son también importantes determinantes inmunológicos.

Así, conforme a este procedimiento, se ha desarrollado un procedimiento de análisis rápido y sensible para el análisis cuantitativo de O-piruvil acetal en Pn4 y O-acetato en Pn9V y Pn18C-Ps. Este procedimiento es valioso para definir el proceso correcto para la clasificación por tamaños y conjugación de Pn4, Pn9V y Pn18C-Ps a fin de que se retenga la estructura antigénica de estos polisacáridos.

Ejemplo 31

Aislamiento del conjugado Pn6B-Ps-MIEP

1. Se almacenaron a 3-8°C hasta su uso dos muestras de la mezcla de reacción conjugada (una representa una muestra dializada en agua de la otra).
2. Se añadió tampón MOPS 0,2 pH 7,2 a las muestras para obtener una concentración final de aproximadamente 7 mM. Se añadió GuHCl sólido a la muestra para conseguir una concentración final de 4,2 M (nota: se deberán añadir 1,42 g de GuHCl/ml de muestra para compensar el incremento de volumen debido a la adición de GuHCl sólido. Igualmente, la adición del tampón se ajustará para tener en cuenta el aumento de volumen de modo que la composición de muestra esté más próxima a la composición del eluyente de la columna. Como alternativa, la muestra podría dializarse frente al eluyente de la columna antes de la cromatografía).
3. Se inyectaron 2,8 ml de muestra (que contenían aproximadamente 1 mg de proteína según el ensayo de proteínas de Lowry) en una columna de 2,6 x 96 cm de Sephacryl S-1000, equilibrada en MOPS 10 mM, pH 7,2, GuHCl 6 M a un caudal de 0,6 ml/min. El efuente de la columna se controló en continuo a 280 nm (detector de ordenación de diodos Perkin Elmer LC 235) y se recogieron fracciones de 3 ml.
4. La distribución de proteínas estuvo basada en A280 (así como en espectros) y la distribución de Pn6B-Ps estuvo basada en un ensayo RIA específico para Pn6B-Ps. Tomando como base las posiciones de elución de Pn6B-Ps-BrAc solo y en mezclas físicas con MIEP inactivado, se realizaron agrupaciones de fracciones que contenían PS y proteína y aquellas que eluyeron de forma distinta de las posiciones observadas para Pn6B-Ps-BrAc se designaron supuestamente como conjugado Pn6B-Ps-MIEP.
5. Las agrupaciones se concentraron por ultrafiltración usando una membrana YM-30 y diafiltraron usando agua Milli-Q. Se estimó el contenido en proteínas y Pn6B-Ps a partir de estudios de composición cuantitativos. La presencia de SCMHC se detectó por análisis de aminoácidos.

Ejemplo 32

Ensayo RIA directo del polisacárido neumocócico Pn18C-Ps

Este ensayo se usa para cuantificar el polisacárido neumocócico tipo 18C. Es un ensayo RIA tipo sándwich multicapa. Se aplica anti-Pn18C-Ps de conejo como revestimiento sobre esferas de poliestireno. Las esferas se incuban en una solución de muestra que contiene Pn18C-Ps. Después de la incubación, se lavan las esferas y se vuelven a incuban en una segunda solución que contiene un anticuerpo de ratón frente a Pn18C-Ps-OMPC. Después de esta incubación, se lavan las esferas y se incuban por tercera vez en una solución que contiene IgG de cabra anti-ratón marcada con ¹²⁵I. Las placas se lavan de nuevo, después de lo cual se traspasan las esferas a tubos de plástico para el recuento. Las muestras desconocidas de Pn18C-Ps se comparan con una curva patrón para su cuantificación.

ES 2 121 820 T5

Equipo

1. Kit RIA: Abbot Labs, Diagnostic Div., N° de catálogo 6171-10.
2. Qwik Wash System, Abbot Labs, Diagnostic Div.
3. Pipetas ajustables y puntas de pipeta desechables (de Eppendorf digital)
4. Contador Gamma (de Abbot Autologic)
5. Esferas de poliestireno de 0,635 cm con acabado espejado: Precision Plastic Ball Co., 3000 N: Cicero Av., Chicago Illinois 60641.

Reactivos

1. Anticuerpo anti-Pn18C-Ps de New York State Health Services, lote R18-44 o equivalente.
2. Antisuero de ratón anti-Pn18C-Ps-OMPC (grupo 11260-235 o equivalente).
3. Antisuero IgG de cabra antiratón marcado con ^{125}I : NEX 159, New England Nuclear, 549 Albany Street, Boston, MA 02118.
4. Tampón de incubación: RCM8 que contiene
 - BSA al 1,0% Sigma A2153
 - Azida al 0,1% Sigma S2002
5. Diluyente
 - 8 partes de suero bovino fetal Sigma F3885
 - 1 parte de suero de cabra Sigma G6767
 - 1 parte de suero de conejo Sigma R4505
 - TWEEN 20 al 0,05% Sigma P1379
 - Azida al 0,1% Sigma S2002
6. Se añade 1 esfera revestida de anti-Pn18C-Ps a cada pocillo de la placa que contiene una muestra o patrón y se agita la placa suavemente para asegurar que todas las esferas están totalmente cubiertas con el tampón.
7. Se cubra la placa con un forro adhesivo suministrado con el estuche RIA y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 6 horas.
8. Se lava la placa usando el aparato Qwik Wash y agua desionizada.
9. Se diluye el anticuerpo de ratón anti-18C 1:1000 en el diluyente.
10. Se añaden 200 μl de esta solución a cada pocillo que contiene una esfera.
11. Se cubre la placa y se incuba durante la noche a temperatura ambiente.
12. Se lava la placa usando el aparato Qwik Wash y agua desionizada.
13. Se diluye el anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con ^{125}I hasta 15000 cpm/10 μl en diluyente (aprox. dilución 1:160).
14. Se añaden 20 μl de esta solución a cada pocillo que contiene una esfera.
15. Se cubre la placa y se incuba a 37°C durante 2 horas.
16. Se lava la placa usando el aparato Qwik Wash y agua desionizada.

ES 2 121 820 T5

14. Se traspasan las esferas a los tubos de plástico suministrados con el estuche RIA y se realiza el recuento usando un contador gamma adecuado.

5 Cálculos

1. Se combinan las mediciones por duplicado para obtener una media para cada muestra, patrón y control de tampón de incubación. Se resta el control de tampón de incubación de todas las muestras y patrones.
2. Usando una calculadora dotada de cálculos estadísticos, se introducen los datos de la curva patrón y se calculan el coeficiente de correlación y la pendiente de la recta.
3. Usando una curva patrón adecuada (libre para libre, conjugado para conjugado), se calcula la respuesta de las muestras y se corrigen las diluciones.

El mismo procedimiento descrito anteriormente puede aplicarse a cualquiera de las demás especies de Pn-Ps sustituyendo los reactivos específicos para cada tipo.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de polisacárido neumocócico-proteína inmunogénica producido mediante el procedimiento de:

- (a) Cultivar un neumococo y aislar polisacárido neumocócico bruto o solubilizar polisacárido neumocócico en polvo;
- (b) Purificar e hidrolizar parcialmente el polisacárido de la etapa (a) hasta un punto final predeterminado generando un polisacárido susceptible de conjugación que no tiene más de 30% de reducción en la antigenicidad específica para un tipo de polisacárido cuando se compara con el polisacárido bruto de la etapa (a); y
- (c) Conjuguar el producto de la etapa (b) con una proteína inmunogénica, seleccionándose el neumococo cultivado en la etapa (a) entre uno o más de los subtipos: 4, 6B, 9V, 1A, 18C, 19F y 23F, en el que el Pn-Ps retiene su integridad antigénica según se mide por ensayo de doble inmunodifusión de Ouchterlony o por ensayo de nefelometría diferencial usando un anticuerpo anti-Pn-Ps específico, habiéndose sometido dicho Pn-Ps antes de la conjugación a un cizallamiento físico en una prensa Gaulin a una presión entre aproximadamente 13,8 MPa y 103 MPa, o a una hidrólisis térmica a 100° durante 24 horas.