

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 571**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2015 PCT/IB2015/050316**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15110942**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2015 E 15708581 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3096786**

54 Título: **Polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

21.01.2014 US 201461929561 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAN, MINGMING;
PRASAD, AVVARI KRISHNA;
COOPER, DAVID y
WATSON, WENDY JO**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 883 571 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* y conjugados de los mismos

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a procedimientos para la preparación de conjugados inmunogénicos que comprenden polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a una proteína portadora, conjugados obtenidos mediante tales procedimientos y composiciones inmunogénicas y vacunas que los comprenden.

Antecedentes

- 10 Los *Streptococcus pneumoniae* son cocos Gram positivos con forma de lanceta que suelen verse en parejas (diplococos), pero también en cadenas cortas o como células individuales. Crecen fácilmente en placas de agar sangre con colonias brillantes y muestran hemólisis alfa a menos que se cultiven anaeróbicamente, donde muestran hemólisis beta. Las células de la mayoría de los serotipos de neumococo tienen una cápsula que es un revestimiento de polisacáridos que rodea a cada célula. Esta cápsula es un factor determinante de la virulencia en los seres humanos, ya que interfiere con la fagocitosis al impedir que los anticuerpos se adhieran a las células bacterianas. Actualmente se conocen más de 90 serotipos capsulares de neumococo, y los 23 serotipos más comunes son responsables de aproximadamente el 90 % de la enfermedad invasiva en todo el mundo. Como vacuna, la capa de polisacárido neumocócico puede conferir un grado razonable de inmunidad frente al *Streptococcus pneumoniae* en individuos con sistemas inmunitarios desarrollados o no deteriorados, pero el polisacárido capsular conjugado con una proteína portadora adecuada permite obtener una respuesta inmunitaria en los lactantes y los ancianos, que también son los que corren más riesgo de contraer infecciones neumocócicas.

Desde la introducción de la primera vacuna neumocócica conjugada de 7 valencias (PCV7 o Prevnar) en el año 2000, la enfermedad invasiva de esos siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) casi ha desaparecido. La adición de los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A en Prevnar 13 disminuyó aún más el número de enfermedades neumocócicas invasivas.

- 25 Sin embargo, la incidencia de enfermedades neumocócicas invasivas causadas por serotipos no vacunales tales como *Streptococcus pneumoniae* del serotipos 15A, 15B y 15C ha aumentado recientemente (véase, por ejemplo, Beall B. et al, Journal of Clinical Microbiology. 44 (3): 999-1017, 2006, o Jacobs et al, Clin Infect Dis. (2008) 47 (11): 1388-1395). Ninguna de las vacunas neumocócicas comercializadas actualmente proporciona una protección adecuada contra el serotipo 15B del *Streptococcus pneumoniae* en humanos y, en particular, en niños menores de 2 años. Por lo tanto, se necesitan composiciones inmunogénicas que puedan utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria contra el serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae*. También sería un beneficio adicional si tal composición inmunogénica pudiera usarse para proteger a los sujetos contra *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15C y/ o 15A.

Sumario de la invención

La invención se refiere a las realizaciones caracterizadas por las reivindicaciones.

- 35 En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido capsular del serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae* enlazado covalentemente a una proteína portadora, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 40 (a) componer un polisacárido capsular activado del serotipo 15B con una proteína portadora, en el que dicho polisacárido activado se obtiene mediante un procedimiento que comprende las etapas de hacer reaccionar un polisacárido capsular aislado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B que comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B, con un agente oxidante, en el que dicho polisacárido activado tiene un peso molecular entre 100 y 300 kDa; y

(b) hacer reaccionar el polisacárido activado compuesto y la proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido capsular del serotipo 15B-proteína portadora;

- 45 en el que la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en DMSO.

La invención también se refiere a un conjugado inmunogénico obtenido mediante el procedimiento de la invención y a una composición inmunogénica que comprende dicho conjugado inmunogénico y un vehículo fisiológicamente aceptable.

- 50 La invención se refiere además a una vacuna que comprende dicha composición inmunogénica y al uso de dicha vacuna y composición inmunogénica para su uso en un procedimiento para proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B o en un procedimiento para tratar o prevenir una infección por *Streptococcus pneumoniae*, enfermedad o afección asociada con el serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae* en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de composición inmunogénica o de dicha vacuna.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un polisacárido capsular aislado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B que tiene un peso molecular entre 5 kDa y 500 kDa.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - Estructura de la unidad repetitiva del polisacárido capsular neumocócico del serotipo 15B

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en el presente documento. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona con conocimientos normales en la técnica a la que pertenece la invención. Al describir las realizaciones y la reivindicación de la invención, se utilizará cierta terminología de acuerdo con las definiciones que se exponen a continuación.

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el "peso molecular" de un polisacárido o de un conjugado polisacárido-proteína portadora se refiere al peso molecular calculado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con un detector de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polisacárido libre" significa un polisacárido capsular del serotipo 15B que no está conjugado covalentemente con la proteína portadora, pero que sin embargo está presente en la composición de conjugado de polisacárido capsular del serotipo 15B-proteína portadora. El polisacárido libre puede estar asociado de forma no covalente (es decir, unido de forma no covalente a, adsorbido a, o atrapado en o con) el conjugado de polisacárido-proteína portadora.

El porcentaje de polisacárido libre se mide después de la purificación final del conjugado de polisacárido capsular del serotipo 15B-proteína portadora. Preferentemente se mide en las 4 semanas siguientes a la purificación final. Se expresa en porcentaje del total de polisacáridos de la muestra.

Como se usa en este documento, el término "polisacárido de serotipo 15B" o "polisacárido capsular de serotipo 15B" se refiere a un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B.

Como se usa en el presente documento, el término "glicoconjugado de serotipo 15B" o "conjugado de serotipo 15B" se refiere a un polisacárido de serotipo 15B aislado conjugado covalentemente a una proteína transportadora.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "grado de oxidación" (DO) se refiere al número de unidades repetitivas de azúcar por grupo aldehído generadas cuando el polisacárido aislado se activa con un agente oxidante. El grado de oxidación de un polisacárido puede determinarse mediante procedimientos rutinarios conocidos por el experto en la técnica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, incluido el ser humano, o a un ave, pez, reptil, anfibio o cualquier otro animal. El término "sujeto" también incluye a los animales domésticos o de investigación. Ejemplos no limitativos de animales domésticos y de investigación son: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, jerbos, hámsters, cobayas, hurones, monos, pájaros, serpientes, lagartos, peces, tortugas y ranas. El término "sujeto" también incluye a los animales de ganado. Ejemplos no limitativos de animales de ganado incluyen: alpaca, bisonte, camello, ganado, ciervos, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, renos, yaks, pollos, gansos y pavos.

Polisacárido capsular aislado del serotipo 15B

Los polisacáridos capsulares 15B aislados no forman parte del asunto objeto reivindicado. Como se muestra en la figura 1, la unidad repetitiva de polisacárido del serotipo 15B consiste en unacolumna vertebral de trisacárido ramificado (una N-acetilglucosamina (Glc_NNAc), una galactopiranososa (Gal_P) y una glucopiranososa (Glc_P)) con una rama de disacárido αGal_P-βGal_P enlazada al grupo hidroxilo C4 de Glc_PNAc. El fosfoglicerol está enlazado al grupo hidroxilo C3 del residuo βGal_P en la rama del disacárido. El polisacárido capsular del serotipo 15B está O-acetilado y la cantidad total de O-acetilación es aproximadamente de 0,8 a 0,9 grupos O-acetilo por unidad repetitiva de polisacárido (véase, por ejemplo, C. Jones et al, Carbohydrate Research, 340 (2005) 403-409). El polisacárido capsular del serotipo 15C tiene la estructura de la columna vertebral idéntica a la del serotipo 15B pero carece de O-acetilación.

El polisacárido del serotipo 15B aislado de la divulgación se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B;
- (b) lisar las células bacterianas en dicho cultivo de fermentación;

(c) purificar el polisacárido del serotipo 15B del cultivo de fermentación; y,

(d) dimensionar el polisacárido purificado del serotipo 15B mediante homogeneización a alta presión.

Los polisacáridos del serotipo 15B pueden obtenerse directamente a partir de bacterias utilizando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, los procedimientos divulgados en las solicitudes de patente U.S. Pub. Nos. 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340 y 20080102498 o WO2008118752). Además, pueden producirse utilizando protocolos sintéticos.

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, la cepa de depósito ATCC No ATCC10354 o la cepa disponible en el Laboratorio de referencia de estreptococos del Centro para el control y la prevención de enfermedades, Atlanta, GA)) o muestras clínicas.

Las células bacterianas se cultivan preferentemente en un medio a base de soja. Tras la fermentación de las células bacterianas que producen polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B, las células bacterianas se lisan para producir un lisado celular. Las células bacterianas pueden ser lisadas utilizando cualquier agente lítico. Un "agente lítico" es cualquier agente que ayuda a la ruptura de la pared celular y a la liberación de autolisina que provoca la lisis celular, incluyendo, por ejemplo, los detergentes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "detergente" se refiere a cualquier detergente aniónico o catiónico capaz de inducir la lisis de las células bacterianas. Ejemplos representativos de tales detergentes para su uso dentro de los procedimientos de la presente invención incluyen el desoxicolato de sodio (DOC), la N-lauroil sarcosina, el ácido quenodesoxicólico de sodio y las saponinas.

En una realización de la presente divulgación, el agente lítico utilizado para lisar las células bacterianas es DOC. El DOC es la sal sódica del ácido biliar desoxicólico, que suele proceder de fuentes biológicas tales como las vacas o los bueyes. El DOC activa la proteína LytA, que es una autolisina que participa en el crecimiento y la división de la pared celular en *Streptococcus pneumoniae*. La proteína LytA tiene dominios de unión a colina en su porción C-terminal, y se sabe que las mutaciones del gen *lytA* producen mutantes LytA que son resistentes a la lisis con DOC.

En una realización de la presente divulgación, el agente lítico utilizado para lisar las células bacterianas es un agente lítico no derivado de animales. Los agentes líticos no derivados de animales para su uso dentro de los procedimientos de la presente divulgación incluyen agentes de fuentes no animales con modos de acción similares a los del DOC (es decir, que afectan a la función LytA y dan lugar a la lisis de las células de *Streptococcus pneumoniae*). Tales agentes líticos no derivados de animales incluyen, pero no se limitan a, análogos de DOC, surfactantes, detergentes y análogos estructurales de la colina. En una realización, el agente lítico no derivado de animales se selecciona del grupo que consiste en ácido decanosulfónico, tert-octilfenoxi poli(oxietileno)etanolos (por ejemplo, Igepal® CA-630, CAS #: 9002-93-1 Louis, MO), condensados de óxido de etileno de octilfenol (por ejemplo, Triton® X-100, disponible en Sigma Aldrich, St. Louis, MO), N-lauroil sarcosina, N-lauroil sarcosina sódica, iminodipropionato de laurilo, dodecil sulfato de sodio, quenodesoxicolato, hiodesoxicolato, glicodesoxicolato, taurodesoxicolato, tauroquenodesoxicolato y colato. En otra realización, el agente lítico no derivado de animales es la N-lauroil sarcosina. En otra realización, el agente lítico es N-lauroil sarcosina sódica.

El polisacárido del serotipo 15B puede entonces aislarse del lisado celular utilizando técnicas de purificación conocidas en el arte, incluyendo el uso de centrifugación, filtración en profundidad, precipitación, ultrafiltración, tratamiento con carbón activo, diafiltración y/o cromatografía en columna (Véase, por ejemplo, la solicitud de Patente U.S. Pub. Nos. 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340 y 20080102498 o WO2008118752). El polisacárido capsular del serotipo 15B, pueden utilizarse entonces para la preparación de conjugados inmunogénicos.

Preferentemente, con el fin de generar conjugados con características de filtrabilidad y/o rendimientos ventajosos, el dimensionamiento del polisacárido a un intervalo de peso molecular (MW) más bajo se realiza antes de la conjugación con una proteína portadora. Ventajosamente, el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 15B se reduce al tiempo que se conservan las características críticas de la estructura del polisacárido, como por ejemplo la presencia de grupos O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 15B se reduce mediante homogeneización mecánica.

En una realización preferida, el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 15B se reduce mediante homogeneización a alta presión. La homogeneización a alta presión logra altas tasas de cizallamiento bombeando la corriente del procedimiento a través de un camino de flujo con dimensiones suficientemente pequeñas. La tasa de cizallamiento se incrementa utilizando una mayor presión de homogeneización aplicada y el tiempo de exposición puede aumentarse recirculando la corriente de alimentación a través del homogeneizador.

El procedimiento de homogeneización a alta presión es particularmente apropiado para reducir el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 15B, preservando al mismo tiempo las características estructurales del polisacárido, como la presencia de grupos O-acetilo.

El polisacárido capsular aislado del serotipo 15B obtenido mediante la purificación del polisacárido del serotipo 15B a partir del lisado de *Streptococcus pneumoniae* y, opcionalmente, el dimensionamiento del polisacárido purificado,

puede caracterizarse por diferentes parámetros que incluyen, por ejemplo, el peso molecular, el mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B o el mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

5 El grado de O-acetilación del polisacárido puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por RMN de protones (véase por ejemplo Lemercinier y Jones (1996) Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones and Lemercinier (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30; 1233-1247, WO 05/033148 o WO00/56357. Otro procedimiento comúnmente utilizado se describe en Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261. Preferentemente, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante un análisis de HPLC iónico.

10 La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular purificado del serotipo 15B, aislado o activado o en un conjugado de polisacárido del serotipo 15B -proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de dicho polisacárido o como el número de grupo O-acetilo por unidad repetitiva de polisacárido.

15 La presencia de cadenas laterales de glicerolfosfato se puede determinar midiendo el glicerol usando cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) después de su liberación por tratamiento del polisacárido con ácido fluorhídrico (HF). La presencia de glicerol en un polisacárido purificado del serotipo 15B, aislado o activado o en un conjugado de polisacárido del serotipo 15B-proteína portadora se expresa como el número de mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 15B.

El polisacárido capsular aislado del serotipo 15B también se puede producir sintéticamente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

20 En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 5 y 500 kDa, 50 y 500 kDa, 50 y 450 kDa, 100 y 400 kDa, 100 y 350 kDa. En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 350 kDa. En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 300 kDa. En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 150 y 300 kDa.

25 En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos acetato 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende acetato al menos 0,7 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, de la divulgación, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC de iones.

35 En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En una realización preferida, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 350 kDa, preferentemente 150 y 350 kDa, y comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

45 En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 350 kDa, preferentemente 150 y 350 kDa, y comprende al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

50 En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 350 kDa, preferentemente 150 y 350 kDa, y comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

Conjugado de polisacárido capsular del serotipo 15B -proteína portadora

El polisacárido capsular aislado del serotipo 15B puede conjugarse con una proteína portadora para obtener un conjugado inmunogénico. El polisacárido aislado se puede conjugar con la proteína portadora mediante procedimientos conocidos por los expertos (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente U.S. Nos. 20060228380, 20070184071, 20070184072, 20070231340, WO2012/119972 o WO2011/100151).

En una realización, de la divulgación, el polisacárido puede activarse con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que podría acoplarse al portador a través de un enlace tioéter obtenido después de la reacción con una proteína portadora activada por maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo usando yodoacetimida o bromoacetato de N-succinimidilo o SIAB, o SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (fabricado opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida de ácido adípico (ADH) y el sacárido derivado con amino se conjuga con la proteína portadora usando la química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en el portador de proteína. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO93/15760, WO 95/08348 y WO 96129094.

Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchos se describen en la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al., 1979,1. Biol. Chern. 254: 2572-4; Hearn et al., 1981, pág. J. Chromatogr.218: 509-18) seguido de reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Esto puede implicar la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, protección/desprotección opcional, de la reacción del grupo hidroxilo primario del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermedio de carbamato de CDI y acoplar el intermedio de carbamato de CDI con un grupo amino en una proteína.

En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido capsular aislado del serotipo 15B se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora. La aminación reductora implica la activación del polisacárido por oxidación y la conjugación del polisacárido activado a una proteína portadora por reducción.

Activación del polisacárido capsular del serotipo 15B

Un polisacárido capsular activado del serotipo 15B se obtiene haciendo reaccionar un polisacárido capsular aislado del serotipo 15B con un agente oxidante. Por ejemplo, dicho polisacárido capsular activado del serotipo 15B se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- (a) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas del serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae*;
- (b) lisar las células bacterianas en dicho cultivo de fermentación;
- (c) purificar el polisacárido del serotipo 15B a partir del cultivo de fermentación.
- (d) dimensionar el polisacárido purificado del serotipo 15B mediante homogeneización a alta presión.
- (e) hacer reaccionar el polisacárido dimensionado del serotipo 15B con un agente oxidante.

En una realización preferida, la concentración de polisacárido capsular aislado del serotipo 15B que se hace reaccionar con un agente oxidante está entre 0,1 y 10 mg/ml, 0,5 y 5 mg/ml, 1 y 3 mg/ml o aproximadamente 2 mg/ml.

En una realización preferida, el agente oxidante es peryodato. El peryodato oxida los grupos hidroxilos vecinos para formar grupos carbonilo o aldehído y provoca la escisión de un enlace C-C. El término "peryodato" incluye tanto el peryodato como el ácido peryódico. Este término también incluye el metaperyodato (IO_4^-) y el ortoperyodato (IO_6^{5-}). El término "peryodato" también incluye las diversas sales de peryodato, incluyendo el peryodato de sodio y el peryodato de potasio. En una realización preferida, el agente oxidante es peryodato de sodio. En una realización preferida, el peryodato utilizado para la oxidación del polisacárido capsular del serotipo 15B es el metaperyodato. En una realización preferida, el peryodato utilizado para la oxidación del polisacárido capsular del serotipo 15B es metaperyodato de sodio.

En una realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con 0,01 a 10, 0,05 a 5, 0,1 a 1, 0,5 a 1, 0,7 a 0,8, 0,05 a 0,5, 0,1 a 0,3 equivalentes molares de agente oxidante. En una realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con aproximadamente 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 equivalente molar de agente oxidante. En una realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con un equivalente molar de aproximadamente 0,15 de agente oxidante. En una realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con un equivalente molar de aproximadamente 0,25 de agente oxidante. En una realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con un equivalente molar de aproximadamente 0,5 de agente oxidante. En una realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con un equivalente molar de aproximadamente 0,6 de agente oxidante. En una realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con un equivalente molar de aproximadamente 0,7 de agente oxidante.

En una realización preferida, la duración de la reacción es de entre 1 y 50, 10 y 30, 15 y 20, 15 y 17 horas o aproximadamente 16 horas.

En una realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene entre 15 y 45 °C, 15 y 30 °C, 20 y 25 °C. En una realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene a aproximadamente 23 °C.

- 5 En una realización preferida, la reacción de oxidación se lleva a cabo en un tampón seleccionado entre fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) o Bis-Tris. En una realización preferida, el tampón es fosfato de potasio.

En una realización preferida el tampón tiene una concentración de entre 1 y 500 mM, 1 y 300 mM, 50 y 200 mM. En una realización preferida, el tampón tiene una concentración de aproximadamente 100 mM.

- 10 En una realización preferida, la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH en la etapa (a) está entre 4 y 8, 5 y 7, 5,5 y 6,5. En una realización preferida, el pH es de aproximadamente 6.

En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se obtiene haciendo reaccionar de 0,5 a 5 mg/ml de polisacárido capsular aislado del serotipo 15B con 0,2 a 0,3 equivalentes molares de peryodato a una temperatura entre 20 y 25 °C.

- 15 En una realización preferida, se purifica el polisacárido capsular activado del serotipo 15B. El polisacárido capsular activado del serotipo 15B se purifica de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la técnica, tales como la cromatografía de permeación en gel (GPC), la diálisis o la ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido capsular activado se purifica por concentración y diafiltración utilizando un dispositivo de ultrafiltración.

- 20 En una realización preferida, la divulgación se refiere a un polisacárido capsular activado del serotipo 15B obtenido u obtenible mediante el procedimiento divulgado anteriormente.

En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido capsular activado del serotipo 15B está entre 2 y 20, 2 y 15, 2 y 10, 2 y 5, 5 y 20, 5 y 15, 5 y 10, 10 y 20, 10 y 15, 15 y 20. En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido capsular activado del serotipo 15B está entre 2 y 10, 4 y 8, 4 y 6, 6 y 8, 6 y 12, 8 y 12, 9 y 11, 10 y 16, 12 y 16, 14 y 18, 16 y 20, 16 y 18, o 18 y 20.

- 25 En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 300 kDa. En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 150 y 300 kDa. En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 250 kDa.

- 30 En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B comprende al menos acetato 0,7 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC de iones.

- 35 En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B comprende al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B comprende al menos glicerol 0,7 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 40 En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 250 kDa y comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 250 kDa y comprende al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 45 En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B tiene un peso molecular entre 100 y 250 kDa y comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos glicerol 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 50 En una realización, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se liofiliza, opcionalmente en presencia de crioprotector/lioprotector. En una realización, dicho crioprotector/lioprotector es un sacárido. En una realización preferida el sacárido se selecciona entre la sacarosa, la trehalosa, la rafinosa, la estaquiosa, la melezitosa, el

dextrano, el manitol, el lactitol y el palatinit. En una realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido capsular activado liofilizado puede entonces componerse con una solución que comprenda la proteína portadora.

5 En otra realización, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se compone con la proteína portadora y se liofiliza, opcionalmente, en presencia del crioprotector/lioprotector. En una realización, dicho crioprotector/lioprotector es un sacárido. En una realización preferida, el sacárido se selecciona entre la sacarosa, la trehalosa, la rafinosa, la estaquiosa, la melezitosa, el dextrano, el manitol, el lactitol y el palatinit. En una realización preferida, el el sacárido es sacarosa. A continuación, el polisacárido co-liofilizado y la proteína portadora pueden resuspenderse en una solución y reaccionar con un agente reductor.

En una realización, la divulgación se refiere a un polisacárido capsular liofilizado activado del serotipo 15B.

10 En una realización, la divulgación se refiere al polisacárido capsular co-liofilizado activado de serotipo 15B y al vehículo proteico capsular co-liofilizado. En una realización preferida, el portador de proteína es CRM₁₉₇.

Conjugación del polisacárido capsular activado del serotipo 15B con una proteína portadora

El polisacárido capsular activado del serotipo 15B puede conjugarse con una proteína portadora mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- 15 a) componer el polisacárido capsular activado del serotipo 15B con una proteína portadora; y
- b) hacer reaccionar el polisacárido capsular activado del serotipo 15B y la proteína portadora compuestos con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido capsular del serotipo 15B: proteína portadora.

20 La conjugación del polisacárido capsular activado del serotipo 15B con un portador de proteínas mediante aminación reductora en dimetilsulfóxido (DMSO) es adecuada para preservar el contenido de O-acetilo del polisacárido en comparación, por ejemplo, con la aminación reductora en solución acuosa, donde el nivel de O-acetilación del polisacárido se reduce significativamente, la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en DMSO.

En una realización preferida, la etapa (a) comprende disolver el polisacárido capsular liofilizado del serotipo 15B en una solución que comprende una proteína portadora y DMSO. En una realización preferida, la etapa (a) comprende la disolución del polisacárido capsular co-liofilizado del serotipo 15B y la proteína portadora en DMSO.

25 En una realización preferida, la concentración de polisacárido capsular activado del serotipo 15B en la etapa (b) está entre 0,1 y 10 mg/ml, 0,5 y 5 mg/ml, 0,5 y 2 mg/ml. En una realización preferida, la concentración de polisacárido capsular activado del serotipo 15B en la etapa (b) es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3 mg/ml.

30 En una realización preferida, la relación de entrada inicial (peso por peso) de polisacárido capsular activado del serotipo 15B con respecto a la proteína portadora está entre 5:1 y 0,1:1, 2:1 y 0,1:1, 2:1 y 1:1, 1,5:1 y 1:1, 0,1:1 y 1:1, 0,3:1 y 1:1, 0,6:1 y 1:1.

35 En una realización preferida, la relación de entrada inicial de polisacárido capsular activado del serotipo 15B con respecto a la proteína portadora es de aproximadamente 0,6:1 a y 1,5:1, preferentemente 0,6: 1 a 1: 1. Tal relación de entrada inicial es particularmente adecuada para obtener niveles bajos de polisacárido libre en el conjugado inmunogénico.

En una realización preferida, la relación de entrada inicial de polisacárido capsular activado del serotipo 15B con respecto a la proteína portadora es de aproximadamente 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 o 2:1.

40 En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o de zinc en presencia de ácidos de Bronsted o de Lewis, boranos de amina, tales como el borano de piridina, el borano de 2-picolina, 2,6-diborano-metanol, el borano de dimetilamina, t-BuMe¹PrN-BH₃, BH₃ de bencilamina o el borano de 5-etil-2-metilpiridina (PEMB). En una realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio. En una realización preferida, el agente reductor es 2-picolina borano de sodio.

45 En una realización preferida, la cantidad de agente reductor usada en la etapa (b) está entre aproximadamente 0,1 y 10 equivalentes molares, 0,5 y 5 equivalentes molares, 1 y 2 equivalentes molares. En una realización preferida, la cantidad de agente reductor usada en la etapa (b) es aproximadamente 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2 equivalentes molares.

En una realización preferida, la duración de la etapa (b) está entre 1 y 60 horas, 10 y 50 horas, 40 y 50 horas; 42 y 46 horas. En una realización preferida, la duración de la etapa (b) es de aproximadamente 44 horas.

50 En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene entre 10 y 40 °C, 15 y 30 °C, o 20 y 26 °C. En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene en aproximadamente 23 °C.

En una realización preferida, el procedimiento para la preparación de un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a una proteína portadora comprende además una etapa (etapa (c)) de cubrimiento del aldehído no reaccionado (inactivación) mediante la adición de NaBH₄.

- 5 En una realización preferida, la cantidad de NaBH₄ usada en la etapa (c) está entre 0,1 y 10 equivalentes molares, 0,5 y 5 equivalentes molares 1 y 3 equivalentes molares. En una realización preferida, la cantidad de NaBH₄ usada en la etapa (c) es aproximadamente 2 equivalentes molares.

En una realización preferida, la duración de la etapa (c) está entre 0,1 y 10 horas, 0,5 y 5 horas, 2 y 4 horas. En una realización preferida, la duración de la etapa (c) es de unas 3 horas.

- 10 En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene entre 15 y 45 °C, 15 y 30 °C o 20 y 26 °C. En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene a aproximadamente 23 °C.

En una realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa b) es superior al 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. En una realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa b) es superior al 60 %. En una realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa b) es superior al 70 %. El rendimiento es la cantidad de polisacárido del serotipo 15B en el conjugado x100/cantidad de polisacárido activado usado en la etapa de conjugación.

- 15 En una realización preferida, el procedimiento para la preparación de un conjugado inmunogénico que comprende polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a una proteína portadora comprende las etapas de:

(a) preparar un cultivo de fermentación de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B;

(b) lisar las células bacterianas en dicho cultivo de fermentación;

(c) purificar el polisacárido del serotipo 15B del cultivo de fermentación;

(d) dimensionar el polisacárido purificado del serotipo 15B mediante homogeneización a alta presión;

- 25 (e) hacer reaccionar el polisacárido dimensionado del serotipo 15B con un agente oxidante;

(f) componer el polisacárido activado del serotipo 15B con una proteína portadora, y

(g) hacer reaccionar el polisacárido activado del serotipo 15B compuesto y la proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido del serotipo 15B -proteína portadora; y,

(h) cubrir el aldehído sin reaccionar (inactivación) mediante la adición de NaBH₄.

- 30 En una realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa g) del procedimiento anterior es superior al 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. En una realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa g) es superior al 60 %. En una realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa g) es superior al 70 %. El rendimiento es la cantidad de polisacárido del serotipo 15B en el conjugado x100/cantidad de polisacárido activado usado en la etapa de conjugación.

- 35 Después de la conjugación del polisacárido capsular del serotipo 15B con la proteína portadora, el conjugado polisacárido-proteína puede ser purificado (enriquecido con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) por una variedad de técnicas conocidas por el experto. Estas técnicas incluyen la diálisis, las operaciones de concentración/diafiltración, la precipitación/elución por filtración de flujo tangencial, la cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y la filtración en profundidad.

- 40 En una realización preferida, la proteína portadora no es tóxica ni reactogénica y se puede obtener en cantidad y pureza suficientes. Las proteínas portadoras deben ser susceptibles de procedimientos de conjugación estándar.

En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se conjuga con una proteína portadora que se selecciona en el grupo que consiste en: DT (toxina diftérica), TT (toxina tetánica) o fragmento C de TT, CRM₁₉₇ (una variante no tóxica pero antigénicamente idéntica de la toxina diftérica) otros mutantes puntuales de DT, tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; supresión o mutación de Glu-148 por Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 por Gly y otras mutaciones divulgadas en US 4709017 o US 4950740; mutación de al menos uno o más residuos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones divulgadas en US 5917017 o US 6455673; o fragmento divulgado en el documento US 5843711, neumolisina neumocócica (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13), incluida la ply detoxificada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (las secuencias de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE se divulgan en WO 00/37105 o WO 00/39299) y fusiones

de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones PhtDE, fusiones PhtBE, Pht A-E (WO 01/98334, WO 03/54007, WO2009/000826), OMPC (proteína de membrana externa meningocócica - usualmente extraída de *N.meningitidis* serogrupo B -) EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenza* - véase, por ejemplo EP 0 594 610 B), o sus equivalentes inmunológicamente funcionales, péptidos sintéticos (EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712, WO 94/03208), las proteínas de la tos ferina (WO 98/58668, EP0471 177), citoquinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (WO10 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) la proteína de superficie neumocócica PspA (WO 02/091998), las proteínas de captación de hierro (WO 01/72337), la toxina A o B de *C. difficile* (WO 00/61761). En una realización, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se conjuga con DT (toxide diftérico). En otra realización, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B está conjugado con TT (toxina tetánica). En otra realización, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se conjuga con el fragmento C del TT. En otra realización, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se conjuga con PD (proteína D de *Haemophilus influenza* - véase, por ejemplo, EP 0 594 610 B).

En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B de la divulgación se conjuga con la proteína CRM₁₉₇. La proteína CRM₁₉₇ es una forma no tóxica de la toxina diftérica pero es inmunológicamente indistinguible de la toxina diftérica. El CRM₁₉₇ es producido por *C. diphtheriae* infectado por el fago no toxigénico β 197^{tox}- creado por mutagénesis con nitrosoguanidina del corinefago beta toxigénico (Uchida, T. et al. 1971, Nature New Biology 233:8-11). El CRM₁₉₇ se purifica mediante ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. La proteína CRM₁₉₇ tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica, pero difiere de ella por un único cambio de base (guanina a adenina) en el gen estructural. Este único cambio de base provoca una sustitución de aminoácidos (ácido glutámico por glicina) en la proteína madura y elimina las propiedades tóxicas de la toxina diftérica. La proteína CRM₁₉₇ es un portador seguro y eficaz de sacáridos dependiente de las células T. Se pueden encontrar más detalles sobre el CRM₁₉₇ y su producción, por ejemplo, en US 5.614.382.

En una realización, la invención se refiere a un conjugado inmunogénico, obtenido mediante el procedimiento de la invención, que comprende polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a una proteína portadora. En una realización, la invención se refiere a un conjugado inmunogénico, obtenido mediante el procedimiento de la invención, que comprende polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a una proteína portadora mediante aminación reductora. En una realización, la invención se refiere a un conjugado inmunogénico, obtenido mediante el procedimiento de la invención, que comprende polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a una proteína portadora mediante aminación reductora en DMSO. En una realización preferida, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En una realización preferida de la divulgación, el polisacárido es un polisacárido capsular aislado del serotipo 15B como se define en el presente documento. En una realización preferida, de la divulgación, el polisacárido es un polisacárido capsular aislado del serotipo 15B, como se define aquí, que ha sido dimensionado mediante homogeneización a alta presión.

En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 o 15 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente el 25 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente el 20 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente el 15 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B.

En una realización preferida, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular entre 3000 y 20000 kDa; 5000 y 10000 kDa; 5000 y 20000 kDa; 8000 y 20000 kDa; 8000 y 16000 kDa; o 10000 y 16000 kDa. El peso molecular del conjugado inmunogénico se mide mediante SEC-MALLS.

En una realización preferida, la relación (peso por peso) del polisacárido capsular del serotipo 15B con respecto a la proteína portadora en el conjugado está entre 0,5 y 3. En una realización preferida, la relación entre el polisacárido capsular del serotipo 15B y la proteína portadora en el conjugado está entre 0,4 y 2, 0,5 y 2, 0,5 y 1,5, 0,5 y 1, 1 y 1,5, 1 y 2. En una realización preferida, la relación entre el polisacárido capsular del serotipo 15B a la proteína portadora en el conjugado está entre 0,7 y 0,9.

El medio de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) puede utilizarse para determinar la distribución del tamaño molecular relativo del conjugado. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se utiliza en columnas alimentadas por gravedad para perfilar la distribución del tamaño molecular de los conjugados. Las moléculas grandes excluidas de los poros del medio eluyen más rápidamente que las moléculas pequeñas. Los colectores de fracciones se utilizan para recoger el eluido de la columna. Las fracciones se analizan colorimétricamente mediante un ensayo de sacáridos. Para la determinación de K_d, las columnas se calibran para establecer la fracción en la que las moléculas están totalmente excluidas (V₀), (K_d=0), y la fracción que representa la máxima retención (V_i), (K_d=1). La fracción a la que

se alcanza un determinado atributo de la muestra (V_e), se relaciona con K_d mediante la expresión, $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$.

En una realización preferida, al menos el 20 % del conjugado inmunogénico tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos el 30 % del conjugado inmunogénico tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos el 40 % del conjugado inmunogénico tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % del conjugado inmunogénico tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos el 60 % del conjugado inmunogénico tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos el 70 % del conjugado inmunogénico tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

En una realización preferida, entre el 40 % y el 90 % del conjugado inmunogénico del serotipo 15B tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre el 50 % y el 90 % del conjugado inmunogénico del serotipo 15B tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre el 65 % y el 80 % del conjugado inmunogénico del serotipo 15B tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

El conjugado inmunogénico comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende al menos acetato 0,7 mM por polisacárido capsular mM del serotipo 15B. En una realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC de iones.

En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el conjugado inmunogénico con mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el conjugado inmunogénico con mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el conjugado inmunogénico con mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,9. En una realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC de iones.

En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el conjugado inmunogénico a mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el conjugado inmunogénico con mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el conjugado inmunogénico con mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,9. En una realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC de iones.

En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende al menos glicerol 0,6 mM por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el conjugado inmunogénico comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B.

El grado de conjugación es el número de residuos de lisina en la proteína portadora que se conjugan con el polisacárido capsular del serotipo 15B. La evidencia de la modificación con lisina de la proteína portadora, debido a enlaces covalentes con los polisacáridos, se obtiene mediante análisis de aminoácidos usando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica. La conjugación da como resultado una reducción en el número de residuos de lisina recuperados, en comparación con el material de partida de la proteína CRM₁₉₇ utilizado para generar los materiales conjugados.

En una realización preferida, el grado de conjugación del conjugado inmunogénico está entre 2 y 15, 2 y 13, 2 y 10, 2 y 8, 2 y 6, 2 y 5, 2 y 4, 3 y 15, 3 y 13, 3 y 10, 3 y 8, 3 y 6, 3 y 5, 3 y 4, 5 y 15, 5 y 10, 8 y 15, 8 y 12, 10 y 15 o 10 y 12. En una realización preferida, el grado de conjugación del conjugado inmunogénico está entre 2 y 5.

Composición inmunogénica

El término "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contenga un antígeno, por ejemplo, un microorganismo o un componente del mismo, cuya composición puede utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Tal como se utiliza en el presente documento, "inmunogénico" significa la capacidad de un antígeno (o un epítipo del antígeno), tal como un polisacárido capsular bacteriano, o un conjugado inmunogénico o composición inmunogénica que comprende un antígeno, para provocar una respuesta inmunitaria en un huésped como un mamífero, ya sea mediada por vía humoral o celular, o ambas.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición inmunogénica que comprende un conjugado de proteína portadora de polisacárido capsular inmunogénico del serotipo 15B obtenido mediante el procedimiento de la invención.

5 En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de unirse al serotipo 15B del *Streptococcus pneumoniae*. En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de unirse al serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae*, medido mediante un ensayo ELISA estándar.

10 En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de unirse al serotipo 15B y 15A y/o 15C del *Streptococcus pneumoniae*. En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de unirse al serotipo 15B y 15A y/o 15C de *Streptococcus pneumoniae*, medido mediante un ensayo ELISA estándar.

15 En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de unirse al serotipo 15B y 15C del *Streptococcus pneumoniae*. En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de unirse al serotipo 15B y 15C de *Streptococcus pneumoniae*, medido mediante un ensayo ELISA estándar.

20 En el procedimiento ELISA (Ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima), los anticuerpos de los sueros de los sujetos vacunados se incuban con polisacáridos que han sido adsorbidos en un soporte sólido. Los anticuerpos unidos se detectan usando anticuerpos de detección secundaria conjugados con enzima.

25 En una realización, dicho ensayo ELISA es el ensayo ELISA estandarizado (OMS) como lo define la OMS en el 'Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of *Streptococcus pneumoniae* serotype specific IgG (Pn PS ELISA).' (accesible en [http://www.vaccine.uab.edu/ELISA %20protocol.pdf](http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf); consultado el 31 de marzo de 2014).

30 El ELISA mide anticuerpos de polisacárido capsular (PS) de tipo IgG específico anti-*Streptococcus pneumoniae* presentes en suero humano. Cuando se añaden diluciones de sueros humanos a placas de microtitulación recubiertas con PS capsulares de tipo específico, los anticuerpos específicos para ese PS capsular se unen a las placas de microtitulación. Los anticuerpos unidos a las placas se detectan usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina seguido de un sustrato de p-nitrofenil fosfato. La densidad óptica del producto final coloreado es proporcional a la cantidad de anticuerpo PS anticapsular presente en el suero.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido de los serotipos 15B de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml según se determina mediante ensayo ELISA.

35 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido de *S. pneumoniae* de serotipos 15C a una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml según se determina mediante ensayo ELISA.

40 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido de *S. pneumoniae* de los serotipos 15B y 15C a una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml según se determina mediante ensayo ELISA.

45 En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de matar la *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B en un ensayo de opsonofagocitosis (OPA) como se divulga en el presente documento. En una realización, la composición inmunogénica divulgada en este documento, cuando se prueba en un ensayo de OPA como se divulga en este documento, tiene un título de OPA mayor que el título de OPA obtenida con un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B nativo no conjugado.

50 En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de matar la *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15C en un ensayo de opsonofagocitosis como se divulga en el presente documento. En una realización, la composición inmunogénica divulgada en este documento, cuando se prueba en un ensayo de OPA como se describe en este documento, tiene un título de OPA mayor que el título de OPA obtenido con un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15C nativo no conjugado.

55 En una realización, la composición inmunogénica descrita en este documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de matar la *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B y 15C y/o 15A en un ensayo de opsonofagocitosis como se divulga en este documento.

En una realización, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento, cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de matar los serotipos 15B y 15C.

El ensayo opsonofagocítico neumocócico (OPA), que mide la muerte de células de *S. pneumoniae* por células efectoras fagocíticas en presencia de anticuerpo funcional y complemento, se considera un sustituto importante para evaluar la eficacia de las vacunas neumocócicas.

El ensayo opsonofagocítico (OPA) se puede realizar incubando en conjunto una mezcla de células de *Streptococcus pneumoniae*, un suero humano inactivado por calor que se va a probar, células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y una fuente de complemento exógeno (por ejemplo, complemento de conejo bebé). La opsonofagocitosis procede durante la incubación y las células bacterianas que están cubiertas con el anticuerpo y el complemento mueren tras la opsonofagocitosis. Las unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias supervivientes que escapan de la opsonofagocitosis se determinan sembrando la mezcla de ensayo. El título de OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano con respecto a los pocillos de control sin suero de prueba. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este límite de muerte del 50 %.

Un título de punto final de 1: 8 o mayor se considera un resultado positivo en estos OPA de tipo inductor de muerte.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra *S. pneumoniae* del serotipo 15B en al menos el 50 % de los sujetos según se determina mediante el ensayo de inducción de muerte opsonofagocítica (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra *S. pneumoniae* del serotipo 15B en al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos 93 % de los sujetos según lo determinado por el ensayo de inducción de muerte opsonofagocítica (OPA).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1: 8 contra *S. pneumoniae* del serotipo 15C en al menos el 50 % de los sujetos según se determina mediante el ensayo de inducción de muerte opsonofagocítica (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1: 8 contra *S. pneumoniae* del serotipo 15C en al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos 95 % de los sujetos según lo determinado por el ensayo de inducción de muerte opsonofagocítica (OPA).

La formulación de la composición inmunogénica del presente de la invención puede llevarse a cabo utilizando procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los conjugados inmunogénicos de la invención pueden formularse con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

En una realización preferida, la composición inmunogénica puede comprender al menos un antígeno adicional. En realizaciones preferidas, la composición inmunogénica puede comprender al menos un polisacárido capsular adicional de *Streptococcus pneumoniae*.

En una realización preferida, la composición inmunogénica puede comprender al menos un polisacárido capsular adicional de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. En una realización preferida, dicha proteína portadora es CRM₁₉₇.

En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica comprende uno o más adyuvantes. Tal como se define en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para mejorar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de esta invención. Así, los adyuvantes se administran a menudo para potenciar la respuesta inmunitaria y son bien conocidos por la persona experimentada. Los adyuvantes adecuados para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a:

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

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

(a) MF59 (PCT Pub. N° WO 90/14837), que contiene un 5 % de escualeno, un 0,5 % de Tween 80 y un 0,5 % de Span 85 (opcionalmente con diversas cantidades de MTP-PE (véase más adelante, aunque no es necesario)) formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador como el modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA),

b) SAF, que contiene un 10 % de escualeno, un 0,4 % de Tween 80, un 5 % de polímero plurónico bloqueado L121 y thr-MDP (véase más adelante), microfluidizado en una emulsión submicrónica o sometida a vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y

c) Sistema adyuvante Ribⁱ™ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene un 2 % de escualeno, un 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo formado por el monofosforilípido A (MPL™) 3-O-deilado descrito en el documento de Patente U.S. No. 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™);

(3) adyuvantes de saponina, como Quil A o STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (Patente U.S. No. 5.057.540) pueden utilizarse o partículas generadas a partir de ellos, como los ISCOM (complejos inmunoestimulantes);

(4) los bacteriallipopolisacáridos, los análogos sintéticos del lípido A, tales como los compuestos de aminoalquilglucosamina-fosfato (AGP), o sus derivados o análogos, disponibles en Corixa, y que se describen en Patente U.S. No. 6, 113.918; uno de estos AGP es el 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido que también se conoce como 529 (antes conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen motivo(s) CpG (Patente U.S. No. 6.207.646);

(5) citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimuladoras 87-1 y 87-2, etc;

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

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

Los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG como adyuvante. Un oligonucleótido CpG, tal y como se utiliza en este documento, se refiere a un oligodeoxinucleótido CpG inmunoestimulador (ODN CpG), por lo que estos términos se utilizan indistintamente a menos que se indique otra cosa. Los oligodeoxinucleótidos CpG inmunoestimuladores contienen uno o más motivos CpG inmunoestimuladores que son dinucleótidos de citosina-guanina no metilados, opcionalmente dentro de ciertos contextos de bases preferidos. El estado de metilación del motivo inmunoestimulador CpG se refiere generalmente al residuo de citosina en el dinucleótido. Un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es un oligonucleótido que contiene una citosina 5' no metilada unida por un enlace fosfato a una guanina 3', y que activa el sistema inmunitario mediante la unión al receptor tipo Toll 9 (TLR-9). En otra realización, el oligonucleótido inmunoestimulador puede contener uno o más dinucleótidos CpG metilados, que activarán el sistema inmunitario a través de TLR9 pero no con tanta fuerza como si el motivo o motivos CpG no estuvieran metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG pueden comprender uno o más palíndromos que a su vez pueden englobar el dinucleótido CpG. Los oligonucleótidos CpG se han descrito en una serie de patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas y otras publicaciones, incluyendo Patentes U.S. Nos. 6.194.388 6,207,646 6,214,806 6,218,371 6,239,116 y 6,339,068.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas divulgada en el presente documentos comprenden cualquiera de los oligonucleótidos CpG descritos en las páginas 3 líneas 22 a la página 12 línea 36 del documento WO2010/125480.

Se han identificado diferentes clases de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. Se denominan clase A, B, C y P, y se describen con más detalle en las páginas 3 líneas 22 a la página 12 línea 36 del documento WO2010/125480. Los procedimientos de la invención abarcan el uso de estas diferentes clases de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG de clase A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG "clase A" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 1). Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de la Clase A incluyen: 5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO: 2); en la que * se refiere a un enlace fosforotioato y _ se refiere a un enlace fosfodiéster.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG de clase B. En una realización, el oligonucleótido CpG para su uso en la presente invención es un oligonucleótido CpG de clase B representado por al menos la fórmula:

- 5' X₁X₂CGX₃X₄ 3', en la que X₁, X₂, X₃ y X₄ son nucleótidos. En una realización, X₂ es adenina, guanina o timina. En otra realización, X₃ es citosina, adenina o timina. Las secuencias de oligonucleótidos CpG de clase B de la invención son las descritas ampliamente en las Patentes U.S. Ps 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116 y 6.339.068. Las secuencias ejemplares incluyen, pero no se limitan a las divulgadas en estas últimas solicitudes y patentes.

En una realización, el oligonucleótido CpG "clase B" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

- 10 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO: 3), o
 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO: 4), o
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 5), o
 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 6), o
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO: 7).
- 15 En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser uniones de fosforotioato. En otra realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces puede ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG haciendo un oligonucleótido CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno pueden sustituir a la 5' T; los ejemplos de sustituciones halógenas incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.
- 20 Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de la Clase B incluyen:
- 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 8), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 9), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 10), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 11), o
 25 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEQ ID NO: 12).

donde * se refiere a un enlace fosforotioato.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG de clase C. En una realización, los oligonucleótidos CpG "clase C" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácido nucleico:

- 30 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 13), o
 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 14), o
 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 15), o
 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 16), o
 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 17), o
 35 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 18), o
 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 19), o
 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 20), o
 5' TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 21), o
 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 22), o
 40 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 23), o
 5' TCGTCGTTTTACGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 24), o
 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (SEQ ID NO: 25).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser uniones de fosforotioato. En otra realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces puede ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG haciendo un oligonucleótido CpG semiblando.

Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de la Clase C incluyen:

- 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 26), o
 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 27), o
 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 28), o
 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 29), o
 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 30), o
 10 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 31), o
 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 32), o
 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 33), o
 5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 34), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 35), o
 15 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 36), o
 5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 37), o
 5' T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*T 3' (SEQ ID NO: 38)

donde * se refiere a un enlace fosforotioato y _ se refiere a un enlace fosfodiéster.

- 20 En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno pueden sustituir a la 5' T; ejemplos de sustituciones halógenas incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.

- En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG de clase P. En una realización, el oligonucleótido CpG para su uso en la presente invención es un oligonucleótido CpG de clase P que contiene un dominio de activación TLR 5' y al menos dos regiones palindrómicas, siendo una de las regiones palindrómicas una región palindrómica 5' de al menos 6 nucleótidos de longitud y conectada a una región palindrómica 3' de al menos 8 nucleótidos de longitud, ya sea directamente o a través de un espaciador, en el que el oligonucleótido incluye al menos un dinucleótido YpR. En una
 25 realización, dicho oligonucleótido no es T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO: 27). En una realización, el oligonucleótido CpG de clase P incluye al menos un dinucleótido CpG no metilado. En otra realización, el dominio de activación de TLR es TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG,
 30 TTT o TTTT. En otra realización, el dominio de activación de TLR está dentro de la región palindrómica 5'. En otra realización, el dominio de activación de TLR está inmediatamente 5' a la región palindrómica 5'.

En una realización, los oligonucleótidos CpG "clase P" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácido nucleico: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGCGCG 3' (SEQ ID NO: 39).

- 35 En dichas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces de fosforotioato. En otra realización, uno o más de los enlaces puede ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG haciendo un oligonucleótido CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno pueden sustituir a la 5' T; ejemplos de sustituciones halógenas incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.

Un ejemplo no limitativo de oligonucleótidos de la Clase P incluye:

5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 40)

- 40 donde * se refiere a un enlace fosforotioato y _ se refiere a un enlace fosfodiéster.

En una realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace fosforotioato. En otra realización, todos los enlaces internucleótidos del oligonucleótido son enlaces de fosforotioato. En otra realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace tipo fosfodiéster. En otra realización, el enlace fosfodiéster es un enlace fosfodiéster. En otra realización se conjuga un grupo lipofílico con el oligonucleótido. En una realización el grupo lipofílico es el colesterol.

- 45 En una realización, todos los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos CpG aquí divulgados son enlaces fosfodiéster (oligonucleótidos "blandos", como se describe en la Solicitud PCT WO2007/026190). En otra realización,

los oligonucleótidos CpG de la invención se hacen resistentes a la degradación (por ejemplo, se estabilizan). Un "oligonucleótido estabilizado" se refiere a un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, a través de una exo o endo nucleasa). La estabilización del ácido nucleico puede lograrse mediante modificaciones de la columna vertebral. Los oligonucleótidos con enlaces de fosforotioato proporcionan una actividad máxima y protegen al oligonucleótido de la degradación por las exo- y endo-nucleasas intracelulares. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden tener una columna vertebral quimérica, que tiene combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. Para los propósitos de la presente invención, una columna vertebral quimérica se refiere a una columna vertebral parcialmente estabilizada, en la que al menos un enlace internucleotídico es fosfodiéster o similar al fosfodiéster, y en la que al menos otro enlace internucleotídico es un enlace internucleotídico estabilizado, en el que el al menos un enlace fosfodiéster o similar al fosfodiéster y el al menos un enlace estabilizado son diferentes. Cuando el enlace fosfodiéster se localiza preferentemente dentro del motivo CpG, tales moléculas se denominan "semiblandas", como se describe en la Solicitud PCT WO2007/026190.

El tamaño del oligonucleótido CpG (es decir, el número de residuos de nucleótidos a lo largo del oligonucleótido) también puede contribuir a la actividad estimulante del oligonucleótido. Para facilitar la captación en las células, el oligonucleótido CpG de la invención tiene preferentemente una longitud mínima de 6 residuos de nucleótidos. Los oligonucleótidos de cualquier tamaño superior a 6 nucleótidos (incluso de muchas kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria si hay suficientes motivos inmunoestimuladores, porque los oligonucleótidos más grandes se degradan dentro de las células. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos CpG tienen una longitud de 6 a 100 nucleótidos, preferentemente de 8 a 30 nucleótidos. En realizaciones importantes, los ácidos nucleicos y oligonucleótidos de la invención no son plásmidos o vectores de expresión.

En una realización, los oligonucleótidos CpG aquí divulgados comprenden sustituciones o modificaciones, como en las bases y/o los azúcares, tal como se describe en los párrafos 134 a 147 del documento WO2007/026190.

En una realización, el oligonucleótido CpG está modificado químicamente. Ejemplos de modificaciones químicas son conocidos por el experto y se describen, por ejemplo, en Uhlmann E. et al. (1990), Chem. Rev. 90:543, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke, S.T. et al. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129 y Hunziker J. et al., (1995), Mod. Sintetizador. Methods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en las que cada modificación se localiza en un puente internucleósido fosfodiéster particular y/o en una unidad de β -D-ribosa particular y/o en una posición de base nucleósida natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto de ADN o ARN natural.

En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos que contienen CpG pueden mezclarse simplemente con portadores inmunogénicos de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo WO03/024480).

En una realización particular de la presente invención, cualquiera de las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprende de $2\mu\text{g}$ a 100mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,1mg a 50 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,2 mg a 10 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, incluso Preferentemente de 0,5 a 2 mg de oligonucleótido CpG, incluso Preferentemente de 0,75 a 1,5 mg de oligonucleótido CpG. En una realización preferida, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento comprende aproximadamente 1mg de oligonucleótido CpG.

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

En una realización preferida, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden además al menos uno de un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de la oxidación de radicales libres, un diluyente o un portador.

La composición inmunogénica puede comprender opcionalmente uno o más tampones fisiológicamente aceptables seleccionados de, pero no limitados a, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En ciertas realizaciones, la formulación está tamponada dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, preferentemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.

La composición inmunogénica puede comprender opcionalmente uno o más tensioactivos no iónicos, incluidos pero no limitados a los ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno, el polisorbato-80 (Tween 80), el polisorbato-60 (Tween 60), el polisorbato-40 (Tween 40) y el polisorbato-20 (Tween 20), los éteres alquílicos de polioxietileno, incluidos pero no limitados a Brij 58, Brij 35, así como otros como Triton X-100; Triton X- 114, NP40, Span 85 y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121). p. ej., Pluronic 121). En una realización preferida, la composición inmunogénica comprende Polisorbato-80 o Polisorbato-40, preferentemente Polisorbato-80. En una realización preferida, la composición inmunogénica comprende Polisorbato-80 en una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 % (siendo preferible hasta aproximadamente 0,25 %) o Polisorbato-40 en una concentración de aproximadamente 0,001 % a 1 % (siendo preferible hasta aproximadamente 0,5 %).

La invención se refiere además a vacunas que comprenden la composición inmunogénica de la invención.

Procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria y proteger contra la infección

La presente divulgación también incluye procedimientos de uso para las composiciones inmunogénicas aquí descritas. Por ejemplo, una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra *Streptococcus pneumoniae*, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae*, o un procedimiento para prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae*, o un procedimiento para reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por *Streptococcus pneumoniae*, los procedimientos comprenden administrar a un sujeto una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B, o un procedimiento para prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B, o un procedimiento para reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B, los procedimientos comprenden administrar a un sujeto una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15C, o un procedimiento para prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15C, o un procedimiento para reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15C, los procedimientos comprenden administrar a un sujeto una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, o un procedimiento para prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, o un procedimiento para reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección por *Streptococcus pneumoniae*, una enfermedad o una afección asociada al serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) de *Streptococcus pneumoniae* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición inmunogénica descrita en el presente documento. Otra realización proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección, enfermedad o afección por *Streptococcus pneumoniae* asociada a un *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de la composición inmunogénica descrita en el presente documento, y utilizando dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto.

En una realización, la divulgación se refiere al uso del conjugado inmunogénico o composición inmunogénica descrita en el presente documento para la fabricación de un medicamento para proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* y/o prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae* y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por *Streptococcus pneumoniae*, y/o proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) y/o prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B), y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B).

En una realización, la divulgación se refiere al uso del conjugado inmunogénico o la composición inmunogénica divulgados en el presente documento para proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae*, y/o prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae*, y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por *Streptococcus pneumoniae*, y/o proteger a un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) y/o prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B), y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado a una infección causada por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B).

Una "respuesta inmunitaria" a una composición inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células a las moléculas presentes en la composición inmunogénica o la

composición de vacuna de interés. A efectos de la presente divulgación, una "respuesta inmunitaria humoral" es una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos e implica la inducción y generación de anticuerpos que reconocen y se unen con cierta afinidad al antígeno de la composición inmunogénica o la vacuna de la divulgación, mientras que una "respuesta inmunitaria mediada por células" es la mediada por las células T y/o otros glóbulos blancos. La "respuesta inmunitaria mediada por células" es provocada por la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas de clase I o clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), CD1 u otras moléculas no clásicas similares al MHC. Esto activa las células T auxiliares CD4+ específicas del antígeno o las células de linfocitos T citotóxicos CD8+ ("CTL"). Los CTL tienen especificidad para los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con las proteínas codificadas por los MHC clásicos o no clásicos y que se expresan en la superficie de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de los microbios intracelulares, o la lisis de las células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica al antígeno por parte de las células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función y concentrar la actividad de las células efectoras no específicas contra las células que presentan péptidos u otros antígenos en asociación con moléculas MHC clásicas o no clásicas en su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras moléculas de este tipo producidas por las células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluidos los derivados de las células T CD4+ y CD8+. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante una serie de ensayos, como por ejemplo, ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, mediante ensayos de linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medición de la producción de citoquinas por las células T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Estos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Erickson et al. (1993) J. Immunol. 151:4189-4199 y Doe et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo sus variaciones, por ejemplo, "tratar" o "tratado") significa uno o más de los siguientes: (i) la prevención de la infección o la reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción de la gravedad o la eliminación de los síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o del trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento puede ser efectuado de manera profiláctica (antes de la infección) o de manera terapéutica (después de la infección). En la presente divulgación, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con una realización particular de la presente divulgación, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo la inmunización profiláctica y/o terapéutica, a un animal huésped contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B). Los métodos de la presente divulgación son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los métodos de la presente divulgación también se pueden practicar en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

Una "cantidad inmunogénica" y una "cantidad inmunológicamente eficaz", ambas utilizadas indistintamente en el presente documento, se refieren a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, ya sea una respuesta celular (células T) o humoral (células B o anticuerpos), o ambas, según las mediciones realizadas mediante ensayos estándar conocidos por un experto en la técnica.

En una realización preferida, dicho sujeto es un humano. En una realización más preferida, dicho sujeto es un recién nacido (es decir, menos de tres meses de edad), un bebé (de 3 meses a un año de edad) o un niño pequeño (es decir, de un año a cuatro años de edad).

En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgada en el presente documentos son para su uso como vacuna.

En tal realización, el sujeto que va a ser vacunado puede ser menor de 1 año de edad. Por ejemplo, el sujeto que va a ser vacunado puede tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses de edad. En una realización, el sujeto que va a ser vacunado tiene aproximadamente 2, 4 o 6 meses de edad. En otra realización, el sujeto que va a ser vacunado es menor de 2 años de edad. Por ejemplo, el sujeto que va a ser vacunado puede tener aproximadamente 12-15 meses de edad. En algunos casos, sólo se necesita una dosis de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención, pero en algunas circunstancias, se puede administrar una segunda, tercera o cuarta dosis (véase la sección de régimen).

En una realización de la presente invención, el sujeto que va a ser vacunado es un adulto humano de 50 años o más, más Preferentemente un adulto humano de 55 años o más. En una realización, el sujeto que va a ser vacunado es un adulto humano de 65 años o más, de 70 años o más, de 75 años o más o de 80 años o más.

En una realización el sujeto que va a ser vacunado es un individuo inmunocomprometido, en particular un humano. Un individuo inmunocomprometido se define generalmente como una persona que muestra una capacidad atenuada o reducida para montar una defensa humoral o celular normal ante el desafío de agentes infecciosos.

En una realización de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado sufre de una enfermedad o afección que deteriora el sistema inmunológico y resulta en una respuesta de anticuerpos que es insuficiente para proteger contra o tratar la enfermedad neumocócica.

En una realización, dicha enfermedad es un trastorno de inmunodeficiencia primaria. Preferentemente, dicho trastorno de inmunodeficiencia primaria se selecciona del grupo que consiste en: inmunodeficiencias combinadas de células T y B, deficiencias de anticuerpos, síndromes bien definidos, enfermedades de desregulación inmunitaria, trastornos de fagocitos, deficiencias de inmunidad innata, trastornos autoinflamatorios y deficiencias del complemento. En una realización, dicho trastorno de inmunodeficiencia primaria se selecciona de lo divulgado en la página 24 línea 11 a la página 25 línea 19 de la Solicitud PCT WO2010/125480.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado padece una enfermedad seleccionada entre los grupos que consisten en: Infección por VIH, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, trastornos cardíacos o pulmonares crónicos, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus, enfermedad hepática crónica, alcoholismo, cirrosis, fugas de líquido cefalorraquídeo, cardiomiopatía, bronquitis crónica, enfisema, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), disfunción del bazo (tal como la enfermedad de células falciformes), falta de función del bazo (asplenia), neoplasia sanguínea, leucemia, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma, insuficiencia renal, síndrome nefrótico y asma.

En una realización de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado sufre de desnutrición.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado está tomando un fármaco o tratamiento que disminuye la resistencia del cuerpo a la infección. En una realización, dicho fármaco se selecciona entre el divulgado en la página 26 línea 33 a la página 26 línea 40 de la Solicitud PCT WO2010/125480.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado es un fumador.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado tiene un recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos) inferior a 5×10^9 células por litro, o inferior a 4×10^9 células por litro, o inferior a 3×10^9 células por litro, o inferior a 2×10^9 células por litro, o inferior a 1×10^9 células por litro, o inferior a $0,5 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,3 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,1 \times 10^9$ células por litro.

Recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos): El número de glóbulos blancos (WBC) en la sangre. Los glóbulos blancos usualmente se miden como parte del CBC (recuento sanguíneo completo). Los glóbulos blancos son las células de la sangre que luchan contra las infecciones y se diferencian de los glóbulos rojos (que transportan oxígeno) conocidos como eritrocitos. Existen diferentes tipos de glóbulos blancos, incluidos los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN), las células en banda (neutrófilos ligeramente inmaduros), los linfocitos de tipo T (células T), los linfocitos de tipo B (células B), los monocitos, los eosinófilos y los basófilos. Todos los tipos de glóbulos blancos se reflejan en el recuento de glóbulos blancos. El intervalo normal del recuento de glóbulos blancos usualmente está entre 4.300 y 10.800 células por milímetro cúbico de sangre. También puede denominarse recuento de leucocitos y puede expresarse en unidades internacionales como $4,3 - 10,8 \times 10^9$ células por litro.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado sufre de neutropenia. En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado tiene un recuento de neutrófilos inferior a 2×10^9 células por litro, o inferior a 1×10^9 células por litro, o inferior a $0,5 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,1 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,05 \times 10^9$ células por litro.

Un recuento bajo de glóbulos blancos o "neutropenia" es una condición caracterizada por niveles anormalmente bajos de neutrófilos en la sangre circulante. Los neutrófilos son un tipo específico de glóbulos blancos que ayudan a prevenir y combatir las infecciones. La razón más común por la que los pacientes con cáncer experimentan neutropenia es como efecto secundario de la quimioterapia. La neutropenia inducida por la quimioterapia aumenta el riesgo de infección del paciente e interrumpe el tratamiento del cáncer.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que va a ser vacunado tiene un recuento de células CD4+ inferior a $500/\text{mm}^3$, o un recuento de células CD4+ inferior a $300/\text{mm}^3$, o un recuento de células CD4+ inferior a $200/\text{mm}^3$, un recuento de células CD4+ inferior a $100/\text{mm}^3$, un recuento de células CD4+ inferior a $75/\text{mm}^3$, o un recuento de células CD4+ inferior a $50/\text{mm}^3$.

Las pruebas de células CD4 se informan normalmente como el número de células en mm^3 . Los recuentos normales de CD4 están entre 500 y 1600, y los recuentos de CD8 están entre 375 y 1100. Los recuentos de CD4 disminuyen drásticamente en las personas con VIH.

En una realización de la invención, cualquiera de los sujetos inmunocomprometidos divulgados en el presente documento es un macho humano o una hembra humana.

La cantidad de un conjugado en una composición se calcula generalmente en base al total de polisacáridos, conjugados y no conjugados para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 μg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 μg de polisacárido no conjugado en una dosis de 100 μg de polisacárido. La contribución de las proteínas al conjugado no suele tenerse en cuenta a la hora

de calcular la dosis de un conjugado. Generalmente, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más particularmente de 1 a 10 µg y más particularmente de 1 a 5 µg. Preferentemente, cada dosis comprenderá aproximadamente 1,1, 2, 2,2, 3, 3,3, 4, 4,4 µg de polisacárido.

5 Las cantidades óptimas de componentes para una composición o vacuna inmunogénica particular pueden determinarse mediante estudios estándar que involucren la observación de las respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Tras la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias vacunas de refuerzo adecuadamente espaciadas.

10 La efectividad de un antígeno como inmunógeno puede medirse mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, tales como los ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de una célula T de lisar su célula diana específica, o midiendo los niveles de actividad de las células B mediante la medición de los niveles de anticuerpos circulantes específicos para el antígeno en el suero. También puede detectarse una respuesta inmunitaria midiendo los niveles séricos de anticuerpos específicos contra el antígeno inducidos tras la administración del mismo y, más concretamente, midiendo la capacidad de los anticuerpos así inducidos para aumentar la capacidad opsonofagocítica de determinados glóbulos blancos, como se describe en el presente documento. El nivel de
15 protección de la respuesta inmunitaria puede medirse desafiando al huésped inmunizado con el antígeno que se le ha administrado. Por ejemplo, si el antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección inducido por la cantidad inmunogénica del antígeno se mide detectando el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de la provocación de los animales con las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección puede medirse midiendo al menos un síntoma asociado a la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada a la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en las vacunas o
20 composiciones inmunogénicas multiantígeno o multicomponente variará con respecto a cada uno de los otros componentes y puede determinarse por procedimientos conocidos por el artesano experto. Estos procedimientos incluirían procedimientos para medir la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*.

25 La divulgación proporciona además anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a los polisacáridos capsulares o conjugados inmunogénicos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, se generan anticuerpos al administrar a un sujeto los polisacáridos capsulares o los conjugados inmunogénicos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos purificados o aislados dirigidos contra uno o más de los polisacáridos capsulares o conjugados inmunogénicos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación son funcionales según la
30 medición de la eliminación de bacterias en un modelo de eficacia animal o mediante un ensayo de eliminación opsonofagocítica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente divulgación proporciona además moléculas de polinucleótidos que codifican un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la divulgación, y una célula, línea celular (tal como células de hibridoma u otras líneas celulares de ingeniería para la producción recombinante de anticuerpos) o un animal transgénico que produce un anticuerpo o una
35 composición de anticuerpos de la divulgación, utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación del polisacárido capsular aislado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B

1.1 Fermentación y Purificación

40 Los polisacáridos capsulares del serotipo 15B pueden obtenerse directamente de las bacterias utilizando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto en la técnica. (véase, por ejemplo, los procedimientos divulgados en las publicaciones de solicitudes de Patente U.S. Pub. Nos. 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340 y 20080102498 o WO2008118752). Los *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B se cultivaron en un frasco de semillas y luego se transfirieron a un fermentador de semillas. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, las células se transfirieron a un fermentador de producción. El caldo de fermentación se
45 inactivó mediante la adición de N-lauroil sarcosina y se purificó por ultrafiltración y diafiltración.

El polisacárido purificado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B fue luego clasificado por homogeneización a alta presión utilizando un homogeneizador PANDA 2K® (GEA Niro Soavi) para producir el polisacárido aislado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B.

50 Preferentemente, el polisacárido capsular aislado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B obtenido por el procedimiento anterior comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B y tiene un peso molecular entre 50 kDa y 500 kDa, preferentemente 150 a 350 kDa

1.2. Oxidación del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B aislado

55 La oxidación del polisacárido se llevó a cabo en un tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0 ± 0,2) mediante la adición secuencial de una cantidad calculada de tampón de fosfato de potasio 500 mM (pH 6,0) y WFI para dar una concentración final de polisacárido de 2,0 g/l. En caso necesario, el pH de la reacción se ajustó a 6,0, aproximadamente. Después del ajuste del pH, la temperatura de reacción se ajustó a 23 ± 2 °C. La oxidación se inició

con la adición de aproximadamente 0,25 equivalentes molares de peryodato de sodio. La reacción de oxidación se realizó a 23 ± 2 °C durante 16 horas aproximadamente.

La concentración y la diafiltración del polisacárido activado se llevaron a cabo utilizando casetes de ultrafiltración de 100K MWCO. La diafiltración se realizó frente a diavolumenes de 20 veces de WFI. El polisacárido activado purificado se almacenó luego a 5 ± 3 °C. El sacárido activado purificado se caracterizó, entre otras cosas, por (i) concentración de sacárido por ensayo colorimétrico; (ii) concentración de aldehído por ensayo colorimétrico; (iii) Grado de oxidación (iv) Peso molecular por SEC-MALLS y (v) la presencia de O-acetilo.

El SEC-MALLS se utiliza para la determinación del peso molecular de los polisacáridos y de los conjugados polisacárido-proteína. La SEC se utiliza para separar los polisacáridos por volumen hidrodinámico. Para la determinación del peso molecular se utilizan detectores de índice de refracción (RI) y de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS). Cuando la luz interactúa con la materia, se dispersa y la cantidad de luz dispersada está relacionada con la concentración, el cuadrado del dn/dc (los incrementos del índice de refracción específico) y la masa molar de la materia. La medición del peso molecular se calcula a partir de las lecturas de la señal de luz dispersa del detector MALLS y de la señal de concentración del detector RI.

El grado de oxidación (DO = moles de unidad repetitiva de azúcar/moles de aldehído) del polisacárido activado se determinó como sigue:

Los moles de la unidad repetitiva de azúcar se determinan por diversos procedimientos colorimétricos, por ejemplo utilizando el procedimiento de Anthrone. Mediante el procedimiento de Anthrone, el polisacárido se descompone primero en monosacáridos por la acción del ácido sulfúrico y el calor. El reactivo de Antrona reacciona con las hexosas para formar un complejo de color amarillo-verde cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 625 nm. Dentro del intervalo del ensayo, la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de hexosa presente.

Los moles de aldehído también se determinan simultáneamente, utilizando el procedimiento colorimétrico MBTH. El ensayo MBTH implica la formación de un compuesto de azina mediante la reacción de grupos aldehídos (de una muestra determinada) con una hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolona (reactivo del ensayo MBTH). El exceso de 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona se oxida para formar un catión reactivo. El catión reactivo y la azina reaccionan para formar un cromóforo azul. El cromóforo formado se lee entonces espectroscópicamente a 650 nm.

Preferentemente, el polisacárido capsular activado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B obtenido mediante el procedimiento anterior comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B y tiene un peso molecular entre 50 kDa y 500 kDa, preferentemente 100 a 250 kDa.

1.3. Conjugación de un polisacárido capsular activado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B con CRM₁₉₇

El procedimiento de conjugación consiste en las siguientes etapas:

- Compuesto con excipiente de sacarosa, y liofilización.
- Reconstitución del polisacárido activado liofilizado y del CRM₁₉₇.
- Conjugación del polisacárido activado con el CRM₁₉₇ y el cubrimiento
- Purificación del conjugado

a) Composición con excipiente de sacarosa y liofilización

El polisacárido activado fue compuesto con sacarosa en una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. El frasco de la mezcla compuesta se liofilizó a continuación. Tras la liofilización, los frascos que contenían el polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20 ± 5 °C. La cantidad calculada de proteína CRM₁₉₇ se congeló externamente y se liofilizó por separado. El CRM₁₉₇ liofilizado se almacenó a -20 ± 5 °C.

b) Reconstitución del polisacárido activado liofilizado y de la proteína CRM₁₉₇

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. Tras la disolución completa del polisacárido, se añadió una cantidad igual de DMSO anhidro al CRM₁₉₇ liofilizado para su reconstitución.

c) Conjugación y cubrimiento

El polisacárido activado reconstituido se combinó con CRM₁₉₇ reconstituido en el recipiente de reacción (relación de entrada: 0,8:1), seguido de una mezcla completa hasta obtener una solución transparente antes de iniciar la conjugación con cianoborohidruro de sodio. La concentración final de polisacárido en la solución de reacción es de aproximadamente 1 g/l. La conjugación se inició añadiendo 1,0 - 1,5 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción y se incubó a 23 ± 2 °C durante 40-48 h. La reacción de conjugación se terminó añadiendo 2 MEq de borohidruro de sodio (NaBH₄) para cubrir los aldehídos sin reaccionar. Esta reacción de cubrimiento continuó a 23 ± 2 °C durante 3 ± 1 h.

d) Purificación del conjugado

La solución de conjugado se diluyó 1:10 con succinato 5 mM-0,9 % salino (pH 6,0) refrigerado en preparación para la purificación por filtración de flujo tangencial utilizando membranas de 100-300 K MWCO. La solución de conjugado diluido se pasó a través de un filtro de 5 µm y la diafiltración se realizó utilizando succinato 5 mM-0,9 % de solución salina (pH 6,0) como medio. Una vez completada la diafiltración, el retentado del conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,22µm.

El conjugado se diluyó adicionalmente con succinato 5 mM/solución salina al 0,9% (pH 6), hasta una concentración de sacárido objetivo de aproximadamente 0,5 mg/ml. Se completó la etapa final de filtración de 0,22 µm para obtener el conjugado inmunogénico.

Preferentemente, el conjugado obtenido mediante el procedimiento anterior comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B, tiene un peso molecular entre 3000 y 20000 kDa y tiene un grado de conjugación entre 2 y 6.

Ejemplo 2: Caracterización de un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a un CRM₁₉₇

El conjugado 1 se preparó mediante el procedimiento divulgado en el ejemplo 1. Los conjugados 2 y 3 se prepararon mediante un procedimiento similar usando diferentes cantidades de agente oxidante. El conjugado 4 se preparó mediante un procedimiento similar excepto que el polisacárido capsular purificado del serotipo 15B no se dimensionó y se activó a un DO más bajo (nivel de oxidación más alto) y la conjugación se realizó en medio acuoso. El conjugado 5 se preparó mediante un procedimiento similar excepto que el polisacárido capsular purificado del serotipo 15B se dimensionó mediante hidrólisis química y la conjugación se realizó en medio acuoso. Los conjugados 6 y 7 se prepararon mediante un procedimiento similar excepto que el polisacárido capsular purificado del serotipo 15B no fue dimensionado. Los conjugados obtenidos se caracterizaron y los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Conjugados de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B-CRM₁₉₇

Conjugado	1	2	3	4	5	6	7
Polisacárido	Dimensionado	Dimensionado	Dimensionado	Nativo	Hidrolizado	Nativo	Nativo
O-Acetilación; Polisacárido (µmol acetato/µmol poli)	0,69	0,69	0,69	1,01	0,66	0,76	NA
Medio disolvente	DMSO	DMSO	DMSO	Acuoso	Acuoso	DMSO	DMSO
Polisacárido activado DO	11,4	5,8	9,7	4,8	8,8	5	12
Polisacárido activado MW	196KDa	218KDa	235KDa	435 KDa	270KDa	431KDa	460KDa
Rendimiento (%)	87,2	64	63,7	96,2	78,8	24,2	26,2
Proporción de proteína sacárido	0,68	0,65	0,71	1,22	1,29	0,9	1,5
Sacárido libre (%)	< 5	< 5	6,1	18,1	14,2	8,8	18
Conjugado MW, SEC-MALLS	6190KDa	7090KDa	7937KDa	1766KDa	1029KDa	6293KDa	4466KDa
O-Acetilación, Conjugado (µmol acetato/µmol poli)	0,68	0,7	0,68	0,61	0,44	0,85	NA
< 0.3 Kd (%), SEC	NA	73	NA	NA	62	NA	NA
Grado de Conj. (AAA); Lys modificado	3,7	3,9	4,1	NA	3,4	NA	NA
% O-acetilo retenido en conjugado	99 %	100 %	99,5 %	60 %	67 %	100 %	NA

El porcentaje de polisacárido libre se mide mediante un procedimiento que utiliza gel de hidróxido de aluminio para unir proteínas y sacáridos unidos covalentemente para su eliminación por centrifugación. Las muestras se mezclan con gel de hidróxido de aluminio tamponado con fosfato y se centrifugan. El sacárido unido se sedimenta con el gel y

el sacárido libre permanece en el sobrenadante. El sobrenadante resultante y las muestras de control se cuantifican mediante ensayos colorimétricos apropiados para determinar el porcentaje de sacárido libre y confirmar la eliminación suficiente de proteína y la recuperación de sacárido.

Para el análisis de aminoácidos, la muestra de polisacárido-proteína se hidroliza primero en sus componentes individuales como aminoácidos libres, usando hidrólisis de ácido clorhídrico (HCl) 6N bajo vacío y calor (160 °C durante 15 minutos). Después de la hidrólisis, las muestras se analizan utilizando el analizador de aminoácidos. Los aminoácidos individuales se separan mediante cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente escalonado de tampón de citrato de sodio con cambios de temperatura y caudal. Después de la separación, la cantidad de cada aminoácido residual se determina cuantitativamente usando un sistema de detección de acoplamiento de ninhidrina poscolumna. En este sistema, la ninhidrina se mezcla con el eluido de la columna en el sistema de reactor poscolumna y la mezcla se pasa al fotómetro. La reacción de la ninhidrina con los aminoácidos eluidos produce un compuesto de color púrpura que se absorbe al máximo a 570 nm. Esta absorbancia es una respuesta lineal (función) de la cantidad de grupos α -amino presentes y esta reacción proporciona un ensayo colorimétrico cuantitativo para todos los compuestos orgánicos con grupos α -amino. En la reacción con iminoácidos tales como prolina e hidroxilprolina, que no tienen grupo amino libre, se genera un compuesto de color amarillo brillante y se monitoriza a 440 nm. Las áreas de los picos para cada aminoácido se calculan usando salidas de longitud de onda de 570 y 440 nm.

El rendimiento se calcula como sigue: (cantidad de polisacárido en el conjugado x100)/cantidad de polisacárido activado.

Los conjugados (4 y 5) generados usando en medio acuoso demostraron una pérdida significativa en los niveles de O-acetilo. Los conjugados generados en disolvente DMSO, usando polisacárido nativo sin dimensionar el MW (6 y 7) no demostraron pérdida en los niveles de O-acetilo. Sin embargo, los rendimientos del conjugado fueron muy pobres además de las malas características de filtrabilidad. Los conjugados generados en DMSO usando polisacáridos que fueron dimensionados por homogeneización a alta presión (1, 2 y 3) tuvieron un alto rendimiento y mejores características de filtrabilidad con una preservación significativa de los niveles de O-acetilo. Estos conjugados también tenían niveles muy bajos de polisacáridos libres.

Ejemplo 3: Ensayo de actividad opsonofagocítica (OPA)

La inmunogenicidad de los conjugados de la invención puede evaluarse utilizando el ensayo opsonofagocítico (OPA) descrito a continuación.

Grupos de 30 ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de edad fueron inmunizados con 0,001 μ g, 0,01 μ g o 0,1 μ g de conjugados de prueba por vía subcutánea en la semana 0. Los ratones fueron reforzados con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y luego sangraron en la semana 4. Se realizaron OPAs específicos del serotipo en muestras de suero de la semana 4.

Se utilizan ensayos OPA para medir anticuerpos funcionales en sueros murinos específicos para *S. pneumoniae* del serotipo 15B. El suero de la prueba se prepara en reacciones de ensayo que miden la capacidad de la inmunoglobulina específica del polisacárido capsular para opsonizar las bacterias, desencadenar la deposición del complemento, facilitando así la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por los fagocitos. El título OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % del recuento bacteriano con respecto a los pocillos de control sin suero de prueba. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este límite de muerte del 50 %.

Los procedimientos de OPA se basaron en los procedimientos descritos en Hu et al., Clin Diagn Lab Immunol 2005;12(febrero (2)):287-95 con las siguientes modificaciones. El suero de prueba se diluyó en serie 2,5 veces y se añadió a las placas de ensayo de microtitulación. Se añadieron bacterias diana vivas del serotipo 15B a los pocillos y las placas se agitaron a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron a los pocillos células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de conejo bebé (de 3 a 4 semanas de edad, Pel-Freez®, 6,25 % de concentración final), y las placas se agitaron a 37 °C durante 45 minutos. Para terminar la reacción, se añadieron 80 μ l de NaCl al 0,9 % a todos los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 10 μ l a los pocillos de las placas de filtro MultiScreen HTS HV (Millipore®) que contenían 200 μ l de agua. El líquido se filtró a través de las placas al vacío, y se añadieron 150 μ l de medio HySoy a cada pocillo y se filtraron. A continuación, las placas de filtro se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche y se fijaron con Destain Solution (Bio-Rad). A continuación, las placas se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron una vez. Las colonias se visualizaron y enumeraron en un Cellular Technology Limited (CTL) ImmunoSpot Analyzer®. Los recuentos crudos de colonias se utilizaron para trazar las curvas de mortalidad y calcular los títulos de OPA.

La inmunogenicidad de los conjugados 1 y 2 se ha probado de acuerdo con el ensayo mencionado anteriormente. También se probaron en el mismo ensayo un conjugado adicional y un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* nativo no conjugado del serotipo 15B (PS no conjugado):

El conjugado 9 se preparó mediante conjugación de polisacárido capsular nativo del serotipo 15B (es decir, no dimensionado) a CRM₁₉₇ mediante aminación reductora en solución acuosa.

Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Títulos de OPA de pruebas con animales

OPA GMT (Media geométrica del título de anticuerpos) (95 % CI)			
	0.001 µg	0.01 µg	0.1 µg
Conjugado 1	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
Conjugado 2	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
Conjugado 9	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
PS no conjugado	-	-	698 (466, 1045)

Como se muestra en la tabla anterior, los conjugados 1 y 2, cuando se administran a ratones, generan anticuerpos capaces de opsonizar el serotipo 15B de *S. pneumoniae*, desencadenando la deposición del complemento, lo que facilita la fagocitosis y la muerte de bacterias por fagocitos. Además, a pesar de su menor peso molecular, también exhibieron un nivel similar de inmunogenicidad en comparación con el conjugado 9 que no ha sido dimensionado.

Ejemplo 4: Respuestas de OPA multifuncionales entre el serotipo 15B y el serotipo 15C

El serogrupo 15 de neumococos incluye cuatro serotipos relacionados estructuralmente: 15A, 15B, 15C y 15F. Los serotipos 15B y 15C no se pueden distinguir mediante técnicas de tipificación genética y tienen una composición similar de polisacárido capsular (PS), excepto que el 15B-PS es la variante O-acetilada de 15C-PS. Para comprender si los anticuerpos PS anti- capsulares para el serotipo 15B tienen una reacción cruzada funcional con el serotipo 15C, se inmunizaron 10 conejos con vacunas PCV16v y PCV20v, ambas conteniendo un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a CRM₁₉₇ como se divulga en este documento como parte de su formulación. Los sueros de antes y después de la vacunación se probaron en ensayos de OPA contra cepas neumocócicas diana de los serotipos 15B y 15C.

De los 10 conejos de cada grupo, el 100 % tuvo respuesta de OPA al serotipo 15B después de la inmunización con un conjugado del serotipo 15B. De estas mismas muestras, el 100 % también tuvo respuesta de OPA al serotipo 15C (Tabla 1 y Tabla 2). Se observaron títulos bajos de OPA en sueros previos a la vacunación en 15C OPA. Sin embargo, un aumento de más de 10 veces el título de GMT OPA con sueros posvacunación en comparación con la prevacunación demostró que los conjugados inmunogénicos de la invención inducen la formación de anticuerpos capaces de matar la *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B y 15C en un OPA.

PCV16v es una composición de conjugados 16 valencias que comprende glicoconjugados de *S. pneumoniae* de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F (16vPnC) todos individualmente conjugados con CRM₁₉₇.

PCV20v es una composición de conjugados de 20 valencia que comprende glicoconjugados de *S. pneumoniae* de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F (20vPnC) todos ellos conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

Tabla 1. Títulos de OPA contra cepas de los serotipos 15B y 15C en sueros de conejo antes y después de la vacunación con PCV16v

Animal	15B OPA		15C OPA	
	Sem. 0	Sem. 4	Sem. 0	Sem. 4
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672

(continuación)

Animal	15B OPA		15C OPA	
	Sem. 0	Sem. 4	Sem. 0	Sem. 4
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	4	2222	98	1075

Tabla 2. Títulos de OPA contra cepas de los serotipos 15B y 15C en sueros de conejo antes y después de la vacunación con PCV20v

Animal	15B OPA		15C OPA	
	Sem. 0	Sem. 4	Sem. 0	Sem. 4
1	4	3784	indeterminable*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	indeterminable*	1316
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	indeterminable*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	indeterminable*	527
10	4	616	indeterminable*	545
GMT	4	1917	77	1515
* El título no se puede determinar debido a malas curvas de muerte.				

5

Listado de secuencias

<110> Pfizer Inc.

<120> Polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae y conjugados de los mismos

<130> PC72026A

10 <150> US 61/929,561

<151> 2014-01-21

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido CpG "Clase A"

20 <400> 1

ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG "Clase A"
 <400> 2
 ggggacgacg tcgtgggggg g 21
 <210> 3
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG "Clase B"
 15 <400> 3
 tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG "Clase B"
 <400> 4
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21
 25 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido CpG "Clase B"
 <400> 5
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24
 <210> 6
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido CpG "Clase B"
 <400> 6
 tcgtcgtttc gtcgtttgt cggt 24
 <210> 7
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG "Clase B"
 10 <400> 7
 tcgtcgtttt gtcgttttt tcga 24
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase B
 <400> 8
 tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21
 20 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido Clase B
 <400> 9
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21
 <210> 10
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase B
 <400> 10
 35 tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt 24
 <210> 11
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase B
 5 <400> 11
 tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase B
 <400> 12
 tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga 24
 15 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 13
 tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22
 <210> 14
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 14
 30 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 15

tcggacgttc ggcgcgccc g 21
 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 16
 tcggacgttc ggcgcgccc 19
 10 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 17
 tcgcgtcgtt cggcgcgccc 20
 <210> 18
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 18
 25 tcgacgttcg gcgcgcgccg 20
 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 19
 tcgacgttcg gcgcgccg 18
 <210> 20
 35 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 20
 tcgctgctgtt cggcgccg 18
 5 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 21
 tcgcgacgtt cggcgcgcg cg 22
 <210> 22
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 22
 20 tcgtcgtttt cggcgcgcg cg 22
 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 23
 tcgtcgtttt cggcgccgc cg 22
 <210> 24
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 35 <400> 24
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
 <210> 25

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido CpG Clase C
 <400> 25
 tcgtcgtttt cggcgcgcg cgt 23
 <210> 26
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótidos Clase C
 <400> 26
 15 tcgcgtcggt cggcgcgcg cg 22
 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 27
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23
 <210> 28
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 30 <400> 28
 tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C

<400> 29
 tcggacgttc ggcgcgccg 19
 <210> 30
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 30
 10 tcgcgtcggtt cggcgcccg 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 31
 tcgacgttcg gcgcgcccg 20
 <210> 32
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 25 <400> 32
 tcgacgttcg gcgcgccg 18
 <210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 33
 tcgcgtcggtt cggcgccg 18
 35 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 34
 5 tcgcgacgtt cggcgcgcg c 22
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 35
 tcgtcgtttt cggcgcgcg c 22
 <210> 36
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 20 <400> 36
 tcgtcgtttt cggcggccgc c 22
 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 37
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
 30 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Oligonucleótido Clase C
 <400> 38
 tcgtcgtttt cggcgcgcg cgt 23

<210> 39

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido CpG Clase P

<400> 39

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 40

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido CpG Clase P

15 <400> 40

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un conjugado inmunogénico que comprende el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B enlazado covalentemente a una proteína portadora, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 5 (a) componer un polisacárido capsular activado del serotipo 15B con una proteína portadora, en el que dicho polisacárido activado se obtiene mediante un procedimiento que comprende las etapas de hacer reaccionar un polisacárido capsular aislado de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B que comprende al menos acetato 0,6 mM por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B, con un agente oxidante, en el que dicho polisacárido activado tiene un peso molecular entre 100 y 300 kDa; y
 - 10 (b) hacer reaccionar el polisacárido activado compuesto y la proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido capsular del serotipo 15B-proteína portadora;

en el que la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en DMSO.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína portadora es CRM₁₉₇.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la concentración de polisacárido capsular activado del serotipo 15B en la etapa (b) está entre 0,1 y 10 mg/ml, 0,5 y 5 mg/ml o 0,5 y 2 mg/ml.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la relación de entrada inicial de polisacárido capsular activado del serotipo 15B a proteína portadora está entre 5:1 y 0,1:1, 2:1 y 0,1:1, 2:1 y 1:1, 1,5:1 y 1:1, 0,1:1 y 1:1, 0,3:1 y 1:1, 0,6:1 y 1:1, o 0,6:1 y 1,5:1.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en la etapa (b), el polisacárido activado se hace reaccionar con entre 1 y 2 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio durante 40 a 50 horas a una temperatura entre 20 a 26 °C.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho procedimiento comprende la siguiente etapa adicional:
 - 25 (c) cubrir el aldehído sin reaccionar mediante la adición de NaBH₄.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho agente oxidante es peryodato.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho agente oxidante es peryodato de sodio.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho agente oxidante es metaperyodato de sodio.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el rendimiento de la etapa de conjugación (b) es superior al 50 %.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho procedimiento comprende además la etapa de formular el conjugado en una vacuna multivalente.
12. Un conjugado inmunogénico obtenido mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho conjugado inmunogénico comprende menos del 40 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B.
14. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular entre: 3000 y 20000 kDa; 5000 y 10000 kDa; 5000 y 20000 kDa; 8000 y 20000 kDa; 8000 y 16000 kDa; o 10000 y 16000 kDa.
15. El conjugado inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la relación de polisacárido capsular del serotipo 15B a proteína portadora en el conjugado está entre 0,4 y 2.
16. El conjugado inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que al menos el 40 % del conjugado inmunogénico tiene una Kd inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B.
17. El conjugado inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que el grado de conjugación está entre: 2 y 15; 2 y 13; 2 y 10; 2 y 8; 2 y 6; 2 y 5; 2 y 4; 3 y 15; 3 y 13; 3 y 10; 3 y 8; 3 y 6; 3 y 5; 3 y 4; 5 y 15; 5 y 10; 8 y 15; 8 y 12; 10 y 15; o 10 y 12.

18. El conjugado inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el que la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el conjugado inmunogénico a mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95, preferentemente al menos 0,7 o al menos 0,9.

5 19. Una composición inmunogénica que comprende un conjugado inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 y un vehículo fisiológicamente aceptable.

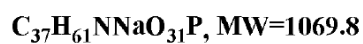
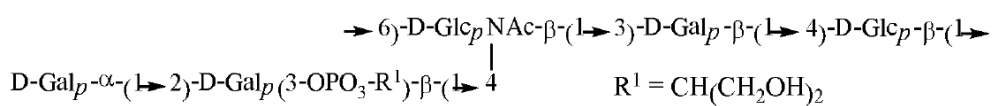
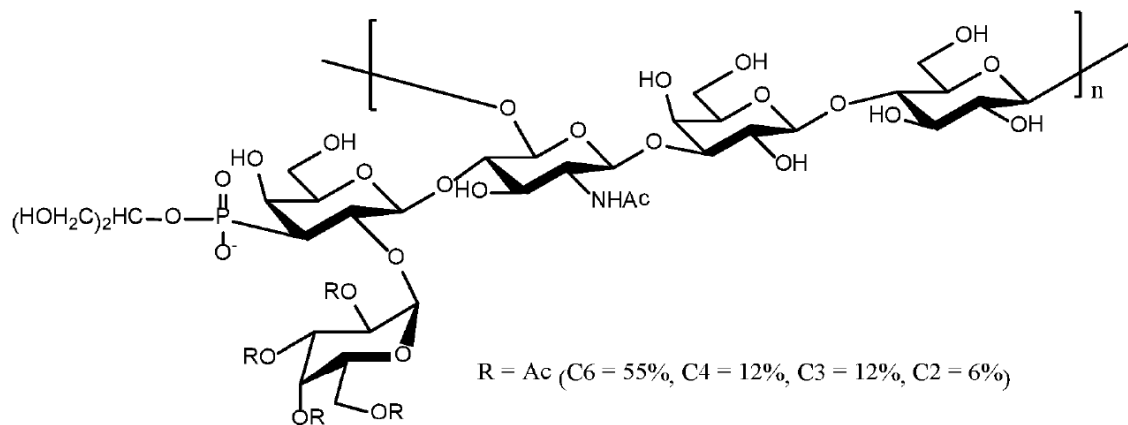
20. Una vacuna que comprende una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19.

21. La composición inmunogénica de la reivindicación 19, o la vacuna de la reivindicación 20, para su uso en un procedimiento de protección de un sujeto contra una infección por *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B.

10 22. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, o la vacuna de la reivindicación 20 para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de una infección, enfermedad o afección por *Streptococcus pneumoniae* asociada con el serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae* en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de composición inmunogénica o de dicha vacuna.

15

Figura 1



Ac= Acetilo