SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-177205- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:29:32 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 262

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: COMPUESTOS BICÍCLICOS Y TRICÍCLICOS COMO INHIBIDORES DE KAT II.

SOLICITANTE: WYETH LLC

DIRECCIÓN: Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 22 de Diciembre de 2011

P2011/000225

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-177205- -00000-0000
Fecha: 2011-12-22 17:29:32 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 262

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2011/000225**

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2)

SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH LLC
Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey, 07940
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/039473 Fecha Junio 22, 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/041003 Fecha Abril 7, 2011

(6) **Título (54) COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE CONJUGADO DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 5 Y 8 DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/085

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Junio 22, 2009	61/219.143
US	Junio 22, 2009	61/219.151

(9) **Comprobante de pago No.** 11- **Fecha** Diciembre de 2011

(10) **ANEXOS**

[x]	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
[x]	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
[x]	Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 10-030.398
[ ]	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
[x]	Declaraciones.
[x]	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
[x]	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
[ ]	Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
[ ]	Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
[ ]	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
[ ]	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
[ ]	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
[ ]	Arte final 12 x 12.
[ ]	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
[ ]	De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
[x]	Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES PCT/US2010/039473

ANDERSON, Annaliesa;
49 Hillcrest Drive,
Upper Saddle River, New Jersey, 07458,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED KINGDOM

DODGE, Ingrid Lea;
23 Grand Street, Cornwall,
New York, 12518,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

FREESE, Stephen John;
2218 Winpost Lane, Apex,
North Carolina, 27502,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

GREEN, Bruce Arthur;
25 Verona Court, New City,
New York, 10956,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

JANSEN, Kathrin Ute;
57 Heather Court, Allendale,
New Jersey, 07401,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: GERMANY;

NANRA, Jasdeep Singh;
195 Old Nyack Turnpike,
Chestnut Ridge, New York, 10977,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: INDIA

PAVLIAK, Viliam;
17 Kevin Drive, Montebello,
New York, 10901,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

PRASAD, A. Krishna; citizen of INDIA;
105 Worsham Drive, Chapel Hill,
North Carolina, 27516,
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

SCOTT, Tracy Dee;
70 Raymond Ridge Road,
Pittsbor, North Carolina, 27312,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 124765

Bogotá D.C., Diciembre 22 de 2011 - 16:10:13

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	408396144	22/12/2011	6.281.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-177205- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:29:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 262

ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

CINCO MIL CIENTO UNO (5101)

FECHA DE OTORGAMIENTO:

CUATRO (4) DE JUNIO DE DOS MIL DIEZ (2010)

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTA D.C.----------

CODIGO NOTARIAL 1100100038.----------

SUPERINTENDENCIA DE NOTARIADO Y REGISTRO.----------

FORMULARIO DE CALIFICACION.----------

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE DOCUMENTOS.----------

PERSONAS QUE INTERVIENEN: CARLOS REINALDO OLARTE, identificado con cedula de ciudadanía numero 79,782,747 expedida en Bogotá D.C.----------

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los CUATRO (04) días del mes de JUNIO de dos mil diez (2.010), ante mi EDUARDO DURAN GOMEZ. **NOTARIO TREINTA Y OCHO (38E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.**----------

Compareció con minuta escrita el señor **CARLOS REINALDO OLARTE**, mayor de edad, con domicilio y residencia en la ciudad de Bogotá, identificado con la cedula de ciudadanía número 79,782,747 de Bogotá D.C., de estado civil Casado, con sociedad conyugal vigente, quien manifestó su propósito de celebrar el acto que define las siguientes estipulaciones: ----------

PRIMERA.- Que presenta para su Protocolización los siguientes documentos:----

1° Traducción oficial de un documento que esta originalmente en ingles contenida en cuatro (4) folios utiles y es del siguiente tenor: ----------

PODER GENERAL.- **WYETH LLC.**- domiciliado en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America.- nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros, representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean

5

administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones, formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la presentación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestro interes.- Firma: Gregg C. Benson.- Fecha: 4 MAY 2010.- Ciudad, País: GROTON, CONNECTICUT USA.----------

CERTIFICACION NOTARIAL.- En esta fecha, May 6 2010.- el Notario Público suscrito certifica: ----------

1. Que GREGG C. BENSON mayor de edad y domiciliado en EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA suscribó el documento que antecede.-----

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ATTORNEY-IN-FACT de WYETH LLC.----------

3. Que WYETH LLC con sede principal ubicada en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.----------

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que está es legitima.----------

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténticado(s): Power of Attorney executed on November 16, 2009.- NOTARY PUBLIC (Signature): (Firmado).-

Nancy M. George.- My Commission Expires 30 June 2011.- (Sellado).----------

TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTA ORIGINALMENTE EN INGLES.- Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mi, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Public, Distrito de Columbia.- Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011.".- (Hay otra firma ilegible).- Apostilla adjunta: Distrito de Columbia.- APOSTILLA: (Convention de La Haye du 5 octobre 1961).----------

1. País: Estados Unidos de América.- El presente documento público.----------

2. Ha sido firmado por: Lisa Renee Johnson.- Notario Público en y para el Distrito de Columbia.----------

3. Actuando en calidad de: Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia.----------

4. Lleva el sello/estampilla de: Certificado.----------

5. En: Washington D.C.----------

6. El: Día 7 de mayo de 2010.----------

7. Por: El Secretario del Distrito de Columbia.----------

8. Bajo el No.: 229806.----------

9. Sello / estampilla: Distrito de Columbia.- (Firmado).----------

10. Firma: Stephanie D.Scott.- Traductor Oficial.- JORGE E. SIERRA REYES.- Licencia 376-1993 Minjusticia.- MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES 160507 'JORGE SIERRA CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS.- NO ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO 2010 MAY 27 A 10:17 (FIRMADO) JEFE DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.----------

DISTRICT OF COLUMBIA.- APOSTILLE.- (Convention de La Haye du 5 octobre 1961).----------

1. District of Columbia United States of America.----------

2. This public document has been sogned by LISA RENEE JOHNSON.----------

3. acting on the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE.-------

4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA.- CERTIFIED.----------

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

5. at Washington, D.C.----------

6. the 7 day of MAY 2010.----------

7. by Secretary of the District of Columbia.----------

8. No. 229806.----------

9. Seal/Stamp.----------

10. Signature.- (Firmado) Stephanie D. Scott.----------

SEGUNDA.-Que de conformidad con lo expuesto y atendiendo a las prescripciones del artículo 47 del Decreto 960 de 1970, el documento mencionado, contenidos en cuatro (4) folios útiles, quedan legalmente protocolizados ante el Notario Treinta y Ocho (38) del Círculo Bogotá, de manera que desde ahora quedan bajo su custodia y guarda para que surtan los efectos legales a que haya lugar y los interesados puedan consultarlos y obtener las copias que de el solicite.-

---------- HASTA AQUÍ EL CONTENIDO -DE LA MINUTA ----------

SE ADVIRTIÓ al (a los) otorgante (s) de esta Escritura de la **obligación que tiene (n) de leer la totalidad de su texto,** a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados con el fin de aclarar, modificar o corregir lo que le(s) pareciere; la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto. ----------

Se advierte igualmente la necesidad de diligenciar los espacios en blanco correspondientes a la información personal y de trabajo consignados en el espacio destinado para la firma de los suscriptores del instrumento publico, con el objeto de confrontar la información solicitada con el contenido de la escritura previo a la autorización de la misma. ----------

En consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por error o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del (los) otorgante (s) y del notario. ----------

En tal caso, de la existencia de estos, deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por el (los) que intervino (eron) en la inicial y sufragada por el (ellos) mismo (s). (Articulo 35 decreto ley 960 de 1.970).----------

ADVERTENCIA PARA TODOS LOS COMPARECIENTES QUE EXTIENDAN Y OTORGUEN INSTRUMENTOS, SEGÚN ART. 34 C.N., LEY 190 DE 1995,

LEY 333 DE 1996 Y LEY 365 DE 1997. Los comparecientes bajo la gravedad del juramento manifiestan clara y expresamente que todos los dineros, bienes muebles e inmuebles contenidos en este instrumento fueron adquiridos por medios y actividades licitas. Así como el dinero con el que se efectúa el pago de los gastos notariales. ----------

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. LEÍDO EL PRESENTE INSTRUMENTO POR EL OTORGANTE Y ADVERTIDO DE SU REGISTRO DENTRO DEL TÉRMINO DE LEY, ESTUVO DE ACUERDO CON ÉL LO ACEPTÓ EN LA FORMA COMO ESTÁ REDACTADO Y EN TESTIMONIO DE QUE LE DA SU ASENTIMIENTO Y APROBACIÓN LO FIRMA POR ANTE MÍ Y CONMIGO EL NOTARIO QUE DE TODO LO EXPUESTO DOY FE Y POR ELLO LO AUTORIZO.----------

CONSTANCIA: EL PRESENTE INSTRUMENTO SE EXTIENDE EN LAS SIGUIENTES HOJAS DE PAPEL NOTARIAL Nos.

/ /00003/ 856805/ 856810/ 856822//

DERECHOS NOTARIALES: RESOLUCIÓN No. 10301 DEL 17 DE DICIEMBRE DE 2.009. $ 42,860

CARLOS REINALDO OLARTE

C. C. No. 79782747 de Bogotá

ESTADO CIVIL: CASADO

DIRECCIÓN RESIDENCIA:

DIRECCIÓN OFICINA: Diagonal 34 No 5-28

TELEFONO RESIDENCIA:

TELEFONO OFICINA: 601-7700

CELULAR: 315 7901625

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

EL(LA) NOTARIO (A) TREINTA Y OCHO (38)

DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

EDUARDO DURAN GOMEZ.

S.B.



YanethG/201005163

L. JUAREZ

Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés

Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mí, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Públic, Distrito de Columbia. Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011."

(Hay otra firma ilegible).

Apostilla adjunta:

Distrito de Columbia	
APOSTILLA:	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
El presente documento público	
2. Ha sido firmado por:	Lisa Renee Johnson
3. Actuando en calidad de:	Notario Público en y para el Distrito de Columbia
4. Lleva el sello/estampilla de:	Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia
Certificado	
5. En:	Washington D.C.
6. El:	Día 7 de mayo de 2010
7. Por:	El Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el No.:	229806
9. Sello / estampilla:	Distrito de Columbia
10. Firma:	(Firmado) Stephanie D. Scott.

Firma de la traductora

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

8

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

160507

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2010 MAY 27 A 10:17

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
   United States of America
2. This public document has been signed by LISA RENEE JOHNSON
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 7 day of MAY 2010
7. by *Secretary of the District of Columbia*
8. No. 229806
9. Seal/Stamp

86 - PO138

10. Signature

Stephanie D. Scott

9

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Alexander Agudelo
Ángela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Gina Arias
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mariana Franco
Monica Guevara
Alvaro Salgado

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

The undersigned, **General Power**

El suscrito, **Poder General**

WYETH LLC

domiciled in

domiciliado en

Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** , legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro.** nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma: Gregg C. Benson
Attorney-in-Fact

Date/Fecha: 4 MAY 2010

City,Country/Ciudad,País: GROTON, CONNECTICUT USA

5/7 Colombia NC

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date, May 6, 2010
The undersigned Notary Public certifies:

1. That

GREGG C. BENSON

of legal age and domiciled in

EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as ATTORNEY-IN-FACT of **WYETH LLC**

3. That **WYETH LLC** having its principal place of business located in Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):
Power of Attorney executed on November 16, 2009

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

GREGG C. BENSON

mayor de edad y domiciliado

EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

de

4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature): Nancy M George
Nancy M. George

NANCY M. GEORGE
Notary Public
My Commission Expires 30 June 2011

10

The District of Columbia: SS
subscribed and sworn to before me
this 7th day of [illegible] 2010

Lisa Renee Johnson
Notary Public, DC
My commission expires 10/14/2011

TERCERA (3) COPIA (FOTOCOPIA) DE LA

ESCRITURA No. 5101 DE FECHA CUATRO DEL MES

DE JUNIO DE 2010 TOMADA DE SU ORIGINAL

CONFORME AL ART. 41 DEL DECRETO 2148 DE 1983, QUE SE EXPIDE EN

BOGOTA D.C., A OCHO DEL MES DE JUNIO

DE DOS MIL DIEZ (2010), EN SIETE

(07) FOLIOS UTILES CON DESTINO A: EL INTERESADO

EDUARDO DURAN GOMEZ

NOTARIO TREINTA Y OCHO (38).

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Burcau

(43) International Publication Date
7 April 2011 (07.04.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/041003 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/085 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/039473

(22) International Filing Date:
22 June 2010 (22.06.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/219,143 22 June 2009 (22.06.2009) US
61/219,151 22 June 2009 (22.06.2009) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **WYETH LLC** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **FREESE, Stephen, John** [US/US]; 2218 Winpost Lane, Apex, North Carolina 27502 (US). **ANDERSON, Annaliesa** [US/US]; 49 Hillcrest Drive, Upper Saddle River, New Jersey 07458 (US). **PAVLIAK, Viliam** [US/US]; 17 Kevin Drive, Montebello, New York 10901 (US). **JANSEN, Kathrin, Ute** [DE/US]; 37 Heather Court, Allendale, New Jersey 07401 (US). **DODGE, Ingrid, Lea** [US/US]; 23 Grand Street, Cornwall, New York 12518 (US). **SCOTT, Tracy, Dee** [US/US]; 70 Raymond Ridge Road, Pittsbor, North Carolina 27312 (US). **NANRA, Jasdeep, Singh** [IN/US]; 195 Old Nyack Turnpike, Chestnut Ridge, New York 10977 (US). **PRASAD, A., Krishna** [IN/US]; 105 Worsham Drive, Chapel Hill, North Carolina 27516 (US). **GREEN, Bruce, Arthur** [US/US]; 25 Verona Court, New City, New York 10956 (US).

(74) Agents: **MOLENDA, Victoria, S.** et al.; Pfizer Inc., Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

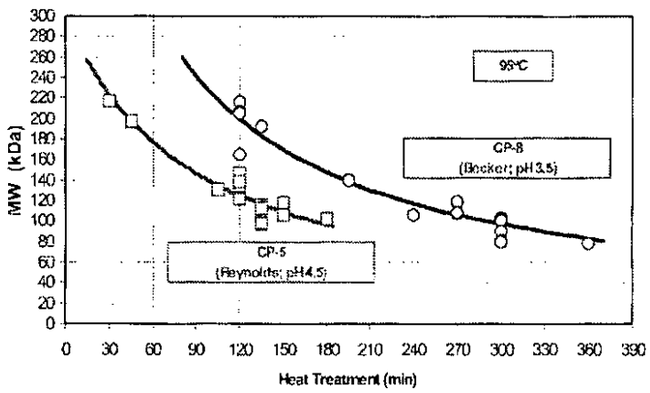
(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREPARING STAPHYLOCOCCUS AUREUS SEROTYPE 5 AND 8 CAPSULAR POLYSACCHARIDE CONJUGATE IMMUNOGENIC COMPOSITIONS

FIGURE 4



(57) Abstract: The present invention relates to immunogenic conjugates comprising S. aureus serotype 5 and 8 capsular polysaccharides conjugated to carrier proteins and methods for their preparation and use. Methods for making the immunogenic conjugates of the invention involve covalent conjugation of the capsular polysaccharides with the carrier proteins using conjugation chemistry involving either 1,1 carboyl di 1,2,4 triazole (CDT) or 3 (2 pyridyldithio) propionyl hydrazide (PDPH).

WO 2011/041003 A2

COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREPARING STAPHYLOCOCCUS AUREUS SEROTYPE 5 AND 8 CAPSULAR POLYSACCHARIDE CONJUGATE IMMUNOGENIC COMPOSITIONS

Cross Reference to Related Applications

[0001] This application claims the priority benefit of U.S. Provisional Patent Application Nos. 61/219,143 and 61/219,151, filed June 22, 2009, the entire disclosures of which are each hereby incorporated by reference herein in their entirety.

Field of the Invention

[0002] The invention relates generally to *Staphylococcus aureus* serotype 5 and 8 capsular polysaccharide conjugate immunogenic compositions and methods for their preparation and use.

Background of the Invention

[0003] Humans are a natural reservoir for Gram-positive *Staphylococcus aureus*. For example, *S. aureus* can colonize the skin, nares and throat, either permanently or transiently, without causing disease. *S. aureus* infections range from mild skin infections to endocarditis, osteomyelitis, bacteremia and sepsis. *S. aureus* also causes a majority of nosocomial infections, and its prevalence in community-onset infections is increasing. Moreover, in 2005, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections were estimated at 31.8 per 100,000 individuals, including 16,650 deaths in the United States in 2005 (Klevens *et al.* (2007) *J. Am. Med.*

Assoc. 298:1763-1771). Disease subsequently occurs when individuals become immunocompromised due to breaches in immune barriers, such as during surgery, placement of indwelling catheters or other devices, trauma or wounds.

[0004] *S. aureus* produces a large number of extra- and intra-cellular antigens, including numerous toxins and enzymes. Of particular interest herein are capsular polysaccharide serotypes of *S. aureus* (*see*, Karakawa & Vann, "Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*," In: Weinstein & Fields, eds. Seminars in Infectious Disease. IV. Bacterial Vaccines. (New York, NY; Thieme Stratton; 1982. pp. 285-293), especially serotype 5 and 8 capsular polysaccharides. Epidemiological studies on a large number of strains of *S. aureus* isolated from individuals showed that 70% to 80% were either serotype 5 or 8 capsular polysaccharide (Arbeit *et al.* (1984) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2:85-91). Unfortunately, the capsular polysaccharides are poor immunogens by themselves.

[0005] Staphylococcal infections and diseases dramatically increased in the last twenty years, as has use of intravascular devices and invasive procedures. The rise in disease incidence is more troubling because of a parallel rise of antibiotic resistance; therefore, there is an urgent need for immunogenic compositions to prevent Staphylococcal infections and diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] The present invention is directed towards immunogenic conjugates comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, and methods for making such conjugates. *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharides may be obtained directly from the bacteria using isolation procedures known to those skilled in the art, may be produced using synthetic protocols, or may be recombinantly produced using genetic engineering procedures also known to those skilled in the art. In addition, the present invention provides methods for inducing an immune response against a *Staphylococcus* bacterium, methods for preventing a disease caused by a *Staphylococcus* bacterium, and methods for reducing the severity of at least one symptom of a disease caused by infection with a *Staphylococcus* bacterium.

[0007] In one embodiment, the invention comprises an immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus*

serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, wherein the polysaccharide has a molecular weight of between 20 kDa and 1000 kDa. In some embodiments, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between 200 kDa and 5000 kDa. In one embodiment the polysaccharide portion of the immunogenic conjugate has a molecular weight range of between 70 kDa and 300 kDa. In one embodiment the immunogenic conjugate has a molecular weight range of between 500 kDa and 2500 kDa.

[0008] In one embodiment, the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide has a degree of O-acetylation between 10-100%. In one embodiment, the degree of O-acetylation is between 50-100%. In one embodiment, the degree of O-acetylation is between 75-100%. In one embodiment, the immunogenic conjugate generates an antibody that is functional as measured by killing bacteria in either an animal efficacy model or via an opsonophagocytic killing assay.

[0009] In one embodiment, the immunogenic conjugate carrier protein comprises CRM_{197}. In one embodiment, the CRM_{197} is covalently linked to the polysaccharide through a carbamate linkage, an amide linkage, or both. In one embodiment, the molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} can be about 10:1 to about 25:1. In one embodiment, the conjugate comprises one covalent linkage between CRM_{197} and polysaccharide for at least every 5 to 10 saccharide repeat units of the polysaccharide. In one embodiment, the linkage between carrier protein and polysaccharide occurs for once in every 5 repeat units of the polysaccharide.

[0010] In one embodiment, the immunogenic conjugate comprising CRM_{197} comprises 5 to 22 lysines or 8 to 15 lysines covalently linked to the polysaccharide. In one embodiment, the immunogenic conjugate comprising CRM_{197} comprises 5 to 23 lysines or 8 to 12 lysines covalently linked to the polysaccharide.

[0011] In one embodiment, the immunogenic conjugate comprises a type 5 or 8 polysaccharide that is 10-100% O-Acetylated. In one embodiment, the immunogenic conjugate comprises a type 5 or 8 polysaccharide that is 50-100% O-Acetylated. In one embodiment, the immunogenic conjugate comprises a type 5 or 8 polysaccharide that is 75-100% O-Acetylated. In some embodiments,

the immunogenic composition can be used to generate antibodies that are functional in an animal efficacy model or an opsonophagocytic killing assay.

[0012] In one embodiment, the immunogenic conjugate comprises less than about 30% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

[0013] In one embodiment, the immunogenic conjugate comprises less than about 20% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

[0014] In one embodiment, the invention comprises an immunogenic composition comprising an immunogenic conjugate as described herein and at least one of an adjuvant, diluent, or carrier.

[0015] The adjuvant can be an aluminum-based adjuvant, such as one or more of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide. In one embodiment the adjuvant comprises aluminum phosphate.

[0016] In one embodiment, the immunogenic composition comprises less than about 30% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

[0017] In one embodiment, the immunogenic composition comprises less than about 20% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

[0018] In one embodiment, the invention comprises a method of inducing an immune response to a *Staphylococcus aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugate in a subject, comprising administering to the subject an immunologically effective amount of an immunogenic composition as described herein.

[0019] In one embodiment, the invention comprises a method of producing an immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of: reacting an isolated *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with 1,1-carbonyl-di-(1,2,4-triazole) (CDT) in an organic solvent to produce an activated serotype 5 or 8 polysaccharide; and reacting the activated serotype 5 or 8 polysaccharide with a

carrier protein in an organic solvent to produce a serotype 5 or 8 polysaccharide:carrier protein conjugate. .

[0020] In one embodiment, the method of activating *Staphylococcus aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide further comprises lyophilizing the isolated serotype 5 or 8 polysaccharide and re-suspending the lyophilized polysaccharide in an organic solvent. In one embodiment, the resuspended polysaccharide is activated and then directly reacted with the carrier protein. In one embodiment, the activated isolated serotype 5 or 8 polysaccharide is isolated prior to reacting with the carrier protein. In one embodiment, the isolated activated isolated serotype 5 or 8 polysaccharide is lyophilized to produce a lyophilized activated isolated serotype 5 or 8 polysaccharide prior to reacting the polysaccharide with carrier protein. In one embodiment, the method of producing an isolated polysaccharide-carrier protein conjugate comprises a step of lyophilizing the carrier protein to produce a lyophilized carrier protein prior to reacting the carrier protein with the polysaccharide. In one embodiment the method of producing an isolated polysaccharide-carrier protein conjugate comprises the step of re-suspending lyophilized activated isolated serotype 5 or 8 polysaccharide and lyophilized carrier protein in an organic solvent as part of the reaction of the activated isolated serotype 5 or 8 polysaccharide with a carrier protein.

[0021] In one embodiment the method of producing an isolated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate comprises the step of diluting the reaction mixture of activated polysaccharide and carrier protein and maintaining a pH of about 8.8 to about 9.2 for at least 4 hours at about 20°C to about 26°C.

[0022] In one embodiment, the reaction mixture of activated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide and carrier protein is maintained at a pH of about 9.0 for at least 4 hours at about 23°C.

[0023] In one embodiment the method of producing an isolated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein comprises the step of isolating the isolated serotype 5 or 8 polysaccharide-protein conjugate after it is produced.

[0024] In one embodiment, the organic solvent used in the method of producing an isolated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate

is a polar aprotic solvent. In one embodiment, the polar aprotic solvent is selected from the group consisting of dimethyl sulfoxide (DMSO), In one embodiment, the method of producing an isolated polysaccharide-carrier protein conjugate the organic solvent is DMSO.

[0025] In one embodiment, the method of producing isolated *S. aureus* type 5 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate comprises the step of adjusting the water concentration of the reaction mixture comprising type 5 capsular polysaccharide and CDT in an organic solvent to between about 0.1 and 0.3%. In one embodiment, the water concentration of the reaction mixture comprising type 5 capsular polysaccharide and CDT in an organic solvent is adjusted to about 0.2%.

[0026] In one embodiment, the step of activating isolated *S. aureus* type 5 capsular polysaccharide comprises reacting the polysaccharide with about an amount of CDT that is 20 molar excess to the amount of polysaccharide present in the reaction mixture comprising type 5 capsular polysaccharide and CDT in an organic solvent.

[0027] In one embodiment, the method of producing isolated *S. aureus* type 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate comprises the step of determining the water concentration of the reaction mixture comprising type 8 capsular polysaccharide. In one embodiment, the amount of CDT added to the reaction mixture to activate the polysaccharide is provided in about an amount of CDT that is equimolar to the amount of water present in the reaction mixture comprising type 8 capsular polysaccharide and CDT in an organic solvent.

[0028] In one embodiment, the amount of CDT added to the reaction mixture to activate the polysaccharide is provided in about an amount of CDT that is at a molar ratio of about 0.5:1 compared to the amount of water present in the reaction mixture comprising type 8 capsular polysaccharide and CDT in an organic solvent. In one embodiment, the amount of CDT added to the reaction mixture to activate the polysaccharide is provided in about an amount of CDT that is at a molar ratio of 0.75:1 compared to the amount of water present in the reaction mixture comprising type 8 capsular polysaccharide and CDT in an organic solvent.

[0029] In one embodiment, the method which comprises the step of isolating the activated polysaccharide comprises the step of diafiltration.

[0030] In one embodiment, the method which comprises lyophilization of the carrier protein, prior to lyophilization the carrier protein is diafiltered against NaCl and the w/w ratio of NaCl/protein carrier protein is adjusted to about 0.5 to about 1.5. In one embodiment, the ratio of NaCl to carrier protein is about 1.

[0031] In one embodiment, the carrier protein used in the method of producing an isolated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate comprises CRM_{197}.

[0032] In one embodiment, the CRM_{197} used in the method of producing an isolated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate is reacted with the activated serotype 5 or 8 polysaccharide at a ratio by weight of about 1:1.

[0033] In one embodiment, the method of producing an isolated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate comprises the step of mixing the type 5 or 8 capsular polysaccharide with imidazole or triazole prior to mixing with CDT in an organic solvent.

[0034] In one embodiment, the method of producing an isolated *S. aureus* type 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate comprises the step of hydrolyzing the serotype 5 or 8 polysaccharide-carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups.

[0035] In one embodiment, the invention provides a method of producing an immunogenic conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of: reacting a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with 3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide (PDPH) and a carbodiimide in an organic solvent to produce a PDPH-linked polysaccharide; reacting the PDPH-linked polysaccharide with a reducing agent to produce an activated polysaccharide; isolating the activated serotype 5 or 8 polysaccharide to produce an isolated activated serotype 5 or 8 polysaccharide; providing an activated carrier protein; reacting the isolated activated serotype 5 or 8 polysaccharide with the activated carrier protein to produce a serotype 5 or 8

polysaccharide-carrier protein conjugate; whereby an immunogenic conjugate comprising an isolated *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein is produced. In one embodiment, the activated carrier protein is isolated prior to reacting the activated carrier protein with the activated polysaccharide.

[0036] In one embodiment, the step of isolating the activated carrier protein further comprises lyophilizing the isolated activated serotype 5 or 8 polysaccharide to produce a lyophilized activated serotype 5 or 8 polysaccharide.

[0037] In one embodiment, the bromoacetic acid is a N-hydroxysuccinimide ester of bromoacetic acid (BAANS).

[0038] In one embodiment, the method of producing serotype 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH comprises the use of an organic solvent that is a polar aprotic solvent. In one embodiment, the polar aprotic solvent is selected from the group consisting of dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide, *N*-methyl-2-pyrrolidone, and hexamethylphosphoramide (HMPA). In one embodiment, the organic solvent is dimethyl sulfoxide (DMSO).

[0039] In one embodiment, the carbodiimide used in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH is 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC).

[0040] In one embodiment, the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC comprises the step of reacting the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with PDPH and EDAC in an organic at a polysaccharide:PDPH:EDAC ratio by weight of about 1:5:3.

[0041] In one embodiment, the reducing agent used in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC is dithiothreitol (DTT).

[0042] In one embodiment, activation of the carrier protein in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC comprises reacting the carrier protein with a bromoacetic acid.

[0043] In one embodiment, the step of isolating the activated serotype 5 or 8 polysaccharide in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC comprises diafiltration.

[0044] In one embodiment, the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC comprises the step of hydrolyzing the serotype 5 or 8 polysaccharide-carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups. In one embodiment, the step of hydrolyzing the serotype 5 or 8 polysaccharide-carrier protein conjugate comprises the addition of cysteamine hydrochloride.

[0045] In one embodiment, the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC further comprises isolating the immunogenic conjugate comprising an isolated *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein.

[0046] In one embodiment, the isolation of the serotype 5 or 8 polysaccharide-carrier protein conjugate comprises diafiltration.

[0047] In one embodiment, the carrier protein used in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC comprises CRM_{197}.

[0048] In one embodiment, the CRM_{197} in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-CRM_{197} conjugate which utilizes PDPH and EDAC is added in a ratio by weight of about 1:1 CRM_{197}:capsular polysaccharide molecule.

[0049] In one embodiment, activated type 5 or 8 capsular polysaccharide used in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC has a size between about 50 kd and about 500 kd.

[0050] In one embodiment, immunogenic conjugate produced in the method of producing serotype 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate which utilizes PDPH and EDAC has a size between about between 400 kd and about 5000 kd.

[0051] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising a type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate produced by any of the methods described herein.

[0052] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising a type 5 or 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate produced by any of the methods described herein and at least one of an adjuvant, diluent or carrier. In one embodiment, the immunogenic compositions comprise an aluminum based adjuvant that can be selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide. In one embodiment, the immunogenic compositions described herein comprise the adjuvant aluminum phosphate.

[0053] The immunogenic compositions described herein can comprise less than 30% and less than 20% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide. The immunogenic compositions described herein can be stored in water or a low ionic strength neutral pH buffer.

[0054] In one embodiment, the invention provides a method of reducing or preventing a Staphylococcal infection, disease or condition associated with a *Staphylococcus* bacteria in a subject, the method comprising the step of administering a therapeutically or prophylactically amount of an immunogenic composition as described herein to the subject. In one embodiment the infection, disease or condition is selected from the group consisting of invasive *Staphylococcus aureus*, sepsis and carriage.

[0055] In one embodiment, the invention provides a method of reducing or preventing a Staphylococcal infection in a subject undergoing a surgical procedure, the method comprising the step of administering a prophylactically effective amount of an immunogenic composition as described herein to the subject prior to the surgical procedure.

[0056] In one embodiment, the method of the invention comprises the substitution of CDI for CDT.

[0057] In one embodiment, the invention provides a *Staphylococcus aureus* Type 5 or 8 capsular polysaccharide having a molecular weight of between 50 kDa and 800 kDa covalently bound to a carrier protein; wherein the combined

molecular weight of the polysaccharide covalently bound to the carrier protein is between about 400 kDa and 5000 kDa.

[0058] In one embodiment, the polysaccharide covalently bound to carrier protein comprises a polysaccharide portion that has a molecular weight range of between 70 kDa and 300 kDa. In one embodiment, the polysaccharide covalently bound to carrier protein has a molecular weight range of between 500 kDa and 2500 kDa.

[0059] In one embodiment, the carrier protein portion of the polysaccharide covalently bound to carrier protein comprises CRM_{197}. In one embodiment the CRM_{197} is covalently linked to the polysaccharide through a carbamate linkage, an amide linkage, or both. In some embodiments, the molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} is about 10:1 to about 25:1. In some embodiments, the polysaccharide covalently bound to carrier protein comprises at least one covalent linkage between CRM_{197} at least at every 5 to 10 saccharide repeat units of the polysaccharide. In some embodiments, the polysaccharide covalently bound to carrier protein comprises at least one linkage between CRM_{197} and polysaccharide occurs at every 5 saccharide repeat units of the polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to the CRM_{197} comprises 5 to 22 lysines covalently linked to the polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to the CRM_{197} comprises 5 to 23 lysines covalently linked to the polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to carrier protein of comprises 8 to 15 lysines covalently linked to the polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to carrier protein of comprises 8 to 12 lysines covalently linked to the polysaccharide.

[0060] In one embodiment the invention provides an immunogenic composition comprising a *S. aureus* type 5 or 8 polysaccharide covalently bound to carrier protein as described herein and at least one of an adjuvant, diluent, or carrier.

[0061] In one embodiment, the invention provides a method of administering an immunogenic composition comprising a *S. aureus* type 5 or 8 polysaccharide

covalently bound to carrier protein as described herein to a subject to generate an immune response as described herein.

[0062] In one embodiment, the invention provides a method of isolating a polysaccharide with a molecular weight between 20 kDa and 1000 kDa.

[0063] In one embodiment, the invention provides an antibody generated by a capsular polysaccharide, an immunogenic conjugate, or an immunogenic composition of the present invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0064] The present invention will be better understood and features, aspects and advantages other than those set forth above will become apparent when consideration is given to the following detailed description thereof. Such detailed description makes reference to the following drawings, wherein:

[0065] **Figure 1** shows a repeating polysaccharide structure of *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide (N-acetyl mannosaminuronic acid is ManNAca, N-acetyl L-fucosamine is L-FucNAc, and N-acetyl D-fucosamine is D-FucNAc).

[0066] **Figure 2A** shows an analysis of fractions from ion exchange chromatography (Q-Sepharose) for *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide (*O*-Acetyl Assay) and teichoic acid (phosphate assay); **Figure 2B** shows an analysis of fractions from ion exchange chromatography (Q-Sepharose) for *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide by double immunodiffusion assay.

[0067] **Figure 3A** shows the effect of pH (3.5, 4 or 5) at 95°C on the reduction of *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide molecular weight in heat treatment; **Figure 3B** shows the effect of temperature (55°C, 75°C or 95°C) at pH 3.5 on the reduction of *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide molecular weight in heat treatment.

[0068] **Figure 4** shows the molecular weight of purified *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide compared to serotype 5 capsular polysaccharide over time during heat treatment at pH 3.5 and 4.5, respectively, and 95°C.

[0069] **Figure 5** shows increased survival in mice that received a serotype 8 capsular polysaccharide-CRM_{197} conjugate (diamonds) compared to $AlPO_4$-treated controls (circles).

[0070] **Figure 6** shows a repeating polysaccharide structure of *S. aureus* serotype 5 polysaccharide (*N*-acetyl mannosaminuronic acid is ManNAcA, *N*-acetyl L-fucosamine is L-FucNAc, and *N*-acetyl D-fucosamine is D-FucNAcA).

[0071] **Figure 7A** shows an analysis of fractions from ion exchange chromatography (Q-Sepharose) for *S. aureus* serotype 5 polysaccharide (O-Acetyl Assay) and teichoic acid (phosphate assay); **Figure 7B** shows an analysis of fractions from ion exchange chromatography (Q-Sepharose) for *S. aureus* serotype 5 polysaccharide by double immunodiffusion assay.

[0072] **Figure 8A** shows the effect of pH (3.5, 4 or 5) at 95°C on the reduction of *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide molecular weight in heat treatment; **Figure 8B** shows the effect of temperature (55°C, 75°C or 95°C) at pH 3.5 on the reduction of *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide molecular weight in heat treatment.

[0073] **Figure 9** shows reduced pyelonephritis in mice that received a serotype 5 polysaccharide-CRM_{197} conjugate compared to PBS-treated controls (shaded area is the treated mice).

[0074] **Figure 10** shows colony forming units (CFU) recovered in kidneys after challenge with *S. aureus* PFESA0266 in mice vaccinated with high molecular weight (HMW) CP5-CRM, low molecular weight (LMW) CP5-CRM or PP5-CRM control

[0075] **Figure 11** shows a comparison of OPA titers (geomean) from serum obtained from mice vaccinated with different formulations of polysaccharide conjugate (high molecular weight (HMW) CP5-CRM, low molecular weight (LMW) CP5-CRM). Groups consisted of 5 to 9 mice.

DETAILED DESCRIPTION

Overview

[0076] The present invention relates to immunogenic conjugates comprising *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharides conjugated to carrier proteins and methods for their preparation and use. Novel features of the immunogenic conjugates of the invention include the molecular weight profiles of the polysaccharides and resulting conjugates, the ratio of conjugated lysines per

CRM_{197} carrier protein and number of lysines covalently linked to the polysaccharide, the number of covalent linkages between the carrier protein and the polysaccharide as a function of repeat units of the polysaccharide, and the relative amount of free polysaccharide compared to the total polysaccharide. The term "free polysaccharide" as used herein means a polysaccharide that is not conjugated to the carrier protein, but is nevertheless present in the conjugate composition.

[0077] Methods for making the immunogenic conjugates of the invention involve covalent conjugation of the capsular polysaccharides with the carrier proteins using conjugation chemistry involving CDI (1,1-carbonyldiimidazole), CDT (1,1-carboyl-di-1,2,4-triazole) or PDPH (3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide). CDI is specific for CP8 conjugation only. Use of CDI/CDT results in a one-carbon or zero-carbon linker between capsular polysaccharide and carrier protein, while use of PDPH results in a covalent thioether bond between capsular polysaccharide and carrier protein.

[0078] Additional cross linkers for –SH (thiolated CP) to $-NH_2$ linkages include but are not limited to: sulfo-LC-SMPT; sulfo-LC-SMPT (4-sulfosuccinimidyl-6-methyl-a-(2-pyridyldithio)toluamido]hexanoate)); sulfo-KMUS (*N*-[k-maleimidoundecanoyloxy]sulfosuccinimide ester); sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl 6-(3'-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoate) which cleaves by thiols; sulfo-SMPB (sulfosuccinimidyl 4-[*p*-maleimidophenyl]butyrate); sulfo-SIAB (*N*-sulfosuccinimidyl[4-iodoacetyl]aminobenzoate); sulfo-EMCS ([N-e-maleimidocaproyloxy]sulfosuccinimide ester); EMCA (N-e-maleimidocaproic acid); sulfo-SMCC (sulfosuccinimidyl 4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate); sulfo-MBS (*m*-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester); sulfo-GMBS (N-[g-maleimidobutyryloxy]sulfosuccinimide ester); BMPA (N-β-maleimidopropionic acid); 2-immunothiolane hydrochloride; 3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-succinimidyl ester; 3-maleimidopropionic acid N-succinimidyl ester; 4-maleimidobutyric acid N-succinimidyl ester; SMPT (4-succinimidyloxycarbonyl-methyl-a-[2-pyridyldithio]toluene); LC-SMCC (succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxy-[6-amidocaproate]); KMUA (N-k-maleimidoundecanoic acid); LC-SPDP (succinimidyl 6-(3-[2-

pyridyldithio]-propionamido)hexanoate); SMPH (succinimidyl-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoate); SMPB (succinimidyl 4-[*p*-maleimidophenyl]butyrate); SIAB (*N*-succinimidyl[4-iodoacetyl]aminobenzoate); EMCS ([N-e-Maleimidocaproyloxy]succinimide ester); SMCC (succinimidyl 4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate); MBS (*m*-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester); SBAP (succinimidyl 3-[bromoacetamido]propionate); BMPS (*N*-[β-maleimidopropyloxy]succinimide ester); AMAS N-(a-maleimidoacetoxy) succinimide ester); SIA (*N*-succinimidyl iodoacetate); and N-succinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoate.

[0079] The agents can also be crosslinked using crosslinkers for -SH to –OH groups. Such cross linkers include but are not limited to PMPI (N-[*p*-maleimidophenyl]isocyanate).

[0080] The compositions and methods described herein are useful in a variety of applications. For example, the conjugates can be used in the production of conjugate immunogenic compositions to protect recipients from *S. aureus* infections. Alternatively, the various conjugates can be used in the production of antibodies against bacterial capsular polysaccharides, which subsequently can be used in research and clinical laboratory assays, such as bacterial detection and serotyping. Such antibodies may also be used to confer passive immunity to a subject. In some embodiments, the antibodies produced against bacterial polysaccharides are functional in either an animal efficacy model or in an opsonophagocytic killing assay.

[0081] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which the invention pertains. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are described herein. In describing the embodiments and claiming the invention, certain terminology will be used in accordance with the definitions set out below.

[0082] As used herein, the singular forms "a," "an," and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. Thus, *e.g.*, references to "the method" includes one or more methods, and/or steps of the type described

herein and/or which will become apparent to one of ordinary skill in the art upon reading this disclosure and so forth.

[0083] As used herein, "about" means within a statistically meaningful range of a value such as a stated concentration range, time frame, molecular weight, temperature or pH. Such a range can be within an order of magnitude, typically within 20%, more typically still within 10%, and even more typically within 5% of a given value or range. The allowable variation encompassed by the term "about" will depend upon the particular system under study, and can be readily appreciated by one of ordinary skill in the art. Whenever a range is recited within this application, every whole number integer within the range is also contemplated as an embodiment of the invention.

[0084] It is noted that in this disclosure, terms such as "comprises," "comprised," "comprising," "contains," "containing" and the like can have the meaning attributed to them in U.S. patent law; *e.g.*, they can mean "includes," "included," "including" and the like. Such terms refer to the inclusion of a particular ingredients or set of ingredients without excluding any other ingredients. Terms such as "consisting essentially of" and "consists essentially of" have the meaning attributed to them in U.S. patent law, *e.g.*, they allow for the inclusion of additional ingredients or steps that do not detract from the novel or basic characteristics of the invention, *i.e.*, they exclude additional unrecited ingredients or steps that detract from novel or basic characteristics of the invention, and they exclude ingredients or steps of the prior art, such as documents in the art that are cited herein or are incorporated by reference herein, especially as it is a goal of this document to define embodiments that are patentable, *e.g.*, novel, non-obvious, inventive, over the prior art, *e.g.*, over documents cited herein or incorporated by reference herein. And, the terms "consists of" and "consisting of" have the meaning ascribed to them in U.S. patent law; namely, that these terms are closed ended. Accordingly, these terms refer to the inclusion of a particular ingredient or set of ingredients and the exclusion of all other ingredients.

Immunogenic conjugates

[0085] As described above, the present invention relates to immunogenic conjugates comprising *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharides

conjugated to carrier proteins. One embodiment of the invention provides immunogenic conjugates comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to carrier molecule or protein having one or more of the following features: the polysaccharide has a molecular weight of between 50 kDa and 700 kDa; the immunogenic conjugate has a molecular weight of between 500 kDa to 2500 KDa; and the conjugate comprises less than about 30% free polysaccharide relative to total polysaccharide. In some embodiments, the polysaccharide has a molecular weight of between 20 kDa and 1000 kDa. In some embodiments the immunogenic conjugate has a molecular weight of between 200 kDa and 5000 kDa. In other embodiments, the conjugate comprises less than about 25%, about 20%, about 15%, about 10%, or about 5% free polysaccharide relative to total polysaccharide.

[0086] The "conjugates" as used herein comprise a capsule polysaccharide usually of a desired range of molecular weight and a carrier protein, wherein the capsule polysaccharide is conjugated to the carrier protein. Conjugates may or may not contain some amount of free capsule polysaccharide. As used herein, "free capsule polysaccharide" refers to capsule polysaccharide that is non-covalently associated with (*i.e.*, non-covalently bound to, adsorbed to or entrapped in or with) the conjugated capsular polysaccharide-carrier protein. The terms "free capsule polysaccharide," "free polysaccharide" and "free saccharide" may be used interchangeably and are intended to convey the same meaning.

[0087] Regardless of the nature of the carrier molecule, it can be conjugated to the capsular polysaccharide either directly or through a linker. As used herein, "to conjugate," "conjugated" and "conjugating" refer to a process whereby a bacterial capsular polysaccharide is covalently attached to the carrier molecule. Conjugation enhances the immunogenicity of the bacterial capsular polysaccharide. The conjugation can be performed according to the methods described below or by other processes known in the art.

[0088] The molecular weight of the *S. aureus* capsular polysaccharide is a consideration for use in immunogenic compositions. High molecular weight capsular polysaccharides are able to induce certain antibody immune responses due

to a higher valence of the epitopes present on the antigenic surface. The isolation of "high molecular weight capsular polysaccharides" is contemplated for use in the compositions and methods of the present invention. In one embodiment of the invention, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 20 kDa to 1000 kDa in molecular weight. In one embodiment of the invention, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 50 kDa to 700 kDa in molecular weight. In one embodiment of the invention, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 50 kDa to 300 kDa in molecular weight. In one embodiment, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 70 kDa to 300 kDa in molecular weight. In one embodiment, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 90 kDa to 250 kDa in molecular weight. In one embodiment, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 90 kDa to 150 kDa in molecular weight. In one embodiment, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 90 kDa to 120 kDa in molecular weight. In one embodiment, high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 80 kDa to 120 kDa in molecular weight. Other ranges of high molecular weight serotype 5 or 8 capsular polysaccharide that can be isolated and purified by the methods of this invention include 70 kDa to 100 kDa in molecular weight; 70 kDa to 110 kDa in molecular weight; 70 kDa to 120 kDa in molecular weight; 70 kDa to 130 kDa in molecular weight; 70 kDa to 140 kDa in molecular weight; 70 kDa to 150 kDa in molecular weight; 70 kDa to 160 kDa in molecular weight; 80 kDa to 110 kDa in molecular weight; 80 kDa to 120 kDa in molecular weight; 80 kDa to 130 kDa in molecular weight; 80 kDa to 140 kDa in molecular weight; 80 kDa to 150 kDa in molecular weight; 80 kDa to 160 kDa in molecular weight; 90 kDa to 110 kDa in molecular weight; 90 kDa to 120 kDa in molecular weight; 90 kDa to 130 kDa in molecular weight; 90 kDa to 140 kDa in molecular weight; 90 kDa to 150 kDa in molecular weight; 90 kDa to 160 kDa in molecular weight; 100 kDa to 120 kDa in molecular weight; 100 kDa to 130 kDa in molecular weight;

100 kDa to 140 kDa in molecular weight; 100 kDa to 150 kDa in molecular weight; 100 kDa to 160 kDa in molecular weight; and similar desired molecular weight ranges. Any whole number integer within any of the above ranges is contemplated as an embodiment of the invention.

[0089] In one embodiment, the conjugate has a molecular weight of between about 50 kDa and about 5000 kDa in molecular weight. In one embodiment, the conjugate has a molecular weight of between about 200 kDa and about 5000 kDa in molecular weight. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 500 kDa and about 2500 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 500 kDa and about 2500 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 600 kDa and about 2800 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 700 kDa and about 2700 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 1000 kDa and about 2000 kDa; between about 1800 kDa and about 2500 kDa; between about 1100 kDa and about 2200 kDa; between about 1900 kDa and about 2700 kDa; between about 1200 kDa and about 2400 kDa; between about 1700 kDa and about 2600 kDa; between about 1300 kDa and about 2600 kDa; between about 1600 kDa and about 3000 kDa. Any whole number integer within any of the above ranges is contemplated as an embodiment of the invention

[0090] As used herein, "immunogenic" means an ability of an antigen (or an epitope of the antigen), such as a bacterial capsular polysaccharide or a conjugate immunogenic composition comprising the antigen, to elicit an immune response in a host such as a mammal, either humorally or cellularly mediated, or both. Accordingly, "immunogenic conjugate" or "conjugate" as used herein means any immunogenic conjugate containing an antigen or antigenic determinant (*i.e.*, epitope) of a bacterial capsular polysaccharide conjugated to a carrier molecule that can be used to elicit an immune response. The immunogenic conjugate may serve to sensitize the host by the presentation of the antigen in association with MHC molecules at a cell surface. In addition, antigen-specific T-cells or antibodies can be generated to allow for the future protection of an immunized

host. Immunogenic conjugates thus can protect the host from one or more symptoms associated with infection by the bacteria, or may protect the host from death due to the infection with the bacteria associated with the capsular polysaccharide. Immunogenic conjugates may also be used to generate polyclonal or monoclonal antibodies, which may be used to confer passive immunity to a subject. Immunogenic conjugates may also be used to generate antibodies that are functional as measured by the killing of bacteria in either an animal efficacy model or via an opsonophagocytic killing assay.

[0091] An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, unless otherwise indicated by context, the term is intended to encompass not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also engineered antibodies (e.g., chimeric, humanized and/or derivatized to alter effector functions, stability and other biological activities) and fragments thereof (such as Fab, Fab', F(ab')2, Fv), single chain (ScFv) and domain antibodies, including shark and camelid antibodies), and fusion proteins comprising an antibody portion, multivalent antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies so long as they exhibit the desired biological activity) and antibody fragments as described herein, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site. An antibody includes an antibody of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any particular class. Depending on the antibody amino acid sequence of the constant domain of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2 in humans. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

[0092] "Antibody fragments" comprise only a portion of an intact antibody, wherein the portion preferably retains at least one, preferably most or all, of the functions normally associated with that portion when present in an intact antibody.

[0093] The term "antigen" generally refers to a biological molecule, usually a protein, peptide, polysaccharide or conjugate in an immunogenic composition, or immunogenic substance that can stimulate the production of antibodies or T-cell responses, or both, in an animal, including compositions that are injected or absorbed into an animal. The immune response may be generated to the whole molecule, or to a various portions of the molecule (*e.g.*, an epitope or hapten). The term may be used to refer to an individual molecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic molecules. An antigen is recognized by antibodies, T-cell receptors or other elements of specific humoral and/or cellular immunity. "Antigen" also includes all related antigenic epitopes. Epitopes of a given antigen can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. *See*, *e.g.*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J. For example, linear epitopes may be determined by, *e.g.*, concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still attached to the supports. Such techniques are known in the art and described in, *e.g.*, US Patent No. 4,708,871; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715; each of which is incorporated herein by reference as if set forth in its entirety. Similarly, conformational epitopes may be identified by determining spatial conformation of amino acids such as by, *e.g.*, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. *See*, *e.g.*, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Furthermore, for purposes of the present invention, "antigen" also can be used to refer to a protein that includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but they may be non-conservative), to the native sequence, so long as the protein maintains the ability to elicit an immunological response. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or through particular synthetic

procedures, or through a genetic engineering approach, or may be accidental, such as through mutations of hosts, which produce the antigens. Furthermore, the antigen can be derived, obtained, or isolated from a microbe, *e.g.*, a bacterium, or can be a whole organism. Similarly, an oligonucleotide or polynucleotide, which expresses an antigen, such as in nucleic acid immunization applications, is also included in the definition. Synthetic antigens are also included, *e.g.*, polyepitopes, flanking epitopes, and other recombinant or synthetically derived antigens (Bergmann *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777 2781; Bergmann *et al.* (1996) *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier (1997) *Immunol. Cell Biol.* 75:402 408; Gardner *et al.* (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 to Jul. 3, 1998).

[0094] A "protective" immune response refers to the ability of an immunogenic composition to elicit an immune response, either humoral or cell mediated, or both, which serves to protect a subject from an infection. The protection provided need not be absolute, *i.e.*, the infection need not be totally prevented or eradicated, if there is a statistically significant improvement compared with a control population of subjects, *e.g.* infected animals not administered the vaccine or immunogenic composition. Protection may be limited to mitigating the severity or rapidity of onset of symptoms of the infection. In general, a "protective immune response" would include the induction of an increase in antibody levels specific for a particular antigen in at least 50% of subjects, including some level of measurable functional antibody responses to each antigen. In particular situations, a "protective immune response" could include the induction of a two fold increase in antibody levels or a four fold increase in antibody levels specific for a particular antigen in at least 50% of subjects, including some level of measurable functional antibody responses to each antigen. In certain embodiments, opsonising antibodies correlate with a protective immune response. Thus, protective immune response may be assayed by measuring the percent decrease in the bacterial count in an opsonophagocytosis assay, for instance those described below. Preferably, there is a decrease in bacterial count of at least 10%, 25%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or more. The "immunogenic amount" of a particular conjugate in a composition are generally dosed based on total polysaccharide, conjugated and

non-conjugated for that conjugate. For example, a serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugate with 20% free polysaccharide will have about 80 mcg of conjugated polysaccharide and about 20 mcg of non-conjugated polysaccharide in a 100 mcg dose. The protein contribution to the conjugate is usually not considered when calculating the dose of a conjugate. The amount of conjugate can vary depending upon the staphylococcal serotype. Generally, each dose will comprise 0.1 to 100 mcg of polysaccharide, particularly 0.1 to 10 mcg, and more particularly 1 to 10 mcg.

[0095] The term "subject" refers to a mammal, bird, fish, reptile, or any other animal. The term "subject" also includes humans. The term "subject" also includes household pets. Non-limiting examples of household pets include: dogs, cats, pigs, rabbits, rats, mice, gerbils, hamsters, guinea pigs, ferrets, birds, snakes, lizards, fish, turtles, and frogs. The term "subject" also includes livestock animals. Non-limiting examples of livestock animals include: alpaca, bison, camel, cattle, deer, pigs, horses, llamas, mules, donkeys, sheep, goats, rabbits, reindeer, yak, chickens, geese, and turkeys.

[0096] As shown in Figure 1, *S. aureus* serotype 5 and 8 capsular polysaccharides have the following structures: serotype 5 [→4)-β-D-ManNAcA-(1→4) -3-O-Ac -α-L-FucNAc-(1→3)-β-DFucNAc-(1→]$_n$. and serotype 8 [→3)-4-O-Ac-β-D-ManNAcA-(1→3)-α-L-FucNAc-(1→3)-β-DFucNAc-(1→]$_n$. *See*, Jones (2005) *Carbohydr. Res.* 340:1097-1106. Serotype 8 capsular polysaccharide has similar trisaccharide repeating units to serotype 5 capsular polysaccharide; however, they differ in the sugar linkages and in sites of *O*-acetylation, which produces serologically distinct patterns of immunoreactivity (Fournier *et al.* (1984) *Infect. Immun.* 45:87-93; and Moreau *et al.* (1990) *Carbohydr. Res.* 201:285-297). Serotype 8 and 5 capsular polysaccharides are therefore relatively complex carbohydrates that are water soluble, usually acidic, and were previously thought to have molecular weights of approximately 25 kDa (Fattom (1990) *Infect. Immun.* 58, 2367-2374).

[0097] In some embodiments, the serotype 5 and/or 8 capsular polysaccharides of the invention are O-acetylated. In some embodiments, the degree of

O-acetylation of type 5 capsular polysaccharide or oligosaccharide is 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%. 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50- 90%, 60-90%, 70-90% or 80-90%. In some embodiments, the degree of O-acetylation of type 8 capsular polysaccharide or oligosaccharide is 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%. 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% or 80-90%. In some embodiments, the degree of O-acetylation of type 5 and type 8 capsular polysaccharides or oligosaccharides is 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%. 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% or 80-90%.

[0098] The degree of O-acetylation of the polysaccharide or oligosaccharide can be determined by any method known in the art, for example, by proton NMR (Lemercinier and Jones 1996, Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones and Lemercinier 2002, J Pharmaceutical and Biomedical analysis 30; 1233-1247, WO 05/033148 or WO 00/56357). Another commonly used method is described by Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261.

[0099] In some embodiments, the serotype 5 and/or 8 capsular polysaccharides of the invention are used to generate antibodies that are functional as measured by the killing of bacteria in an animal efficacy model or an opsonophagocytic killing assay that demonstrates that the antibodies kill the bacteria. Functional killing may not be demonstrated using an assay that monitors the generation of antibodies alone, which is not indicative of the importance of O-acetylation in efficacy.

[0100] Capsular polysaccharides such as serotype 5 or 8 can be obtained directly from bacteria using isolation procedures known to one of ordinary skill in the art. *See*, *e.g.*, Fournier *et al.* (1984), *supra*; Fournier *et al.* (1987) *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138:561-567; US Patent Application Publication No, 2007/0141077; and Int'l Patent Application Publication No. WO 00/56357; each of which is incorporated herein by reference as if set forth in its entirety). In addition, they can be produced using synthetic protocols. Moreover, serotype 5 or 8 capsular polysaccharide can be recombinantly produced using genetic engineering procedures also known to one of ordinary skill in the art (*see*, Sau *et al.* (1997) *Microbiology* 143:2395-2405; and US Patent No. 6,027,925; each of which is incorporated herein by reference as if set forth in its entirety).

[0101] One *S. aureus* strain that can be used to obtain isolated serotype 8 capsular polysaccharide is *S. aureus* R2 PFESA0286. This strain was selected by flow cytometry with rabbit anti-serotype 8 polysaccharide antibodies after cultivation of *S. aureus* PFESA0286 (American Type Culture Collection; Manassas, VA; ATCC Accession No. 49525;) in Modified Frantz Broth. Two populations, R1 and R2, were observed during flow cytometry. R1 and R2 were purified and re-cultured. R2 yielded a serotype 8 capsular polysaccharide. Flow cytometric analysis showed a homogenous fluorescence intensity. As such, R2 was selected for serotype 8 capsular polysaccharide production.

[0102] One *S. aureus* strain that can be used to obtain isolated serotype 5 capsular polysaccharide is *S. aureus* PFESA0266. This strain produces serotype 5 capsular polysaccharide during growth, and production peaks when cells are in a stationary phase. Other S. *aureus* type 5 or type 8 strains can be used to make the respective polysaccharides that are obtained either from established culture collections or clinical specimens.

[0103] Another component of the immunogenic conjugate of the invention is a carrier molecule or protein to which the bacterial capsular polysaccharide is conjugated. The term "protein carrier" or "carrier protein" refers to any protein molecule that may be conjugated to an antigen (such as the capsular polysaccharides) against which an immune response is desired. Conjugation to an carrier can enhance the immunogenicity of the antigen. The conjugation can be performed by standard procedures. Preferred protein carriers for the antigens are toxins, toxoids or any mutant cross-reactive material (CRM) of the toxin from tetanus, diphtheria, pertussis, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus* and *Streptococcus*. In one embodiment, a particularly preferred carrier is of diphtheria toxoid CRM_{197}, derived from *C. diphtheriae* strain C7 (β197), which produces CRM_{197} protein. This strain has ATCC accession No. 53281. A method for producing CRM_{197} is described in US Patent No. 5,614,382, which is incorporated herein by reference as if set forth in its entirety. Alternatively, a fragment or epitope of the protein carrier or other immunogenic protein can be used. For example, a haptenic antigen can be coupled to a T-cell epitope of a bacterial toxin, toxoid or CRM. *See*, US Patent Application No. 150,688, filed Feb. 1, 1988,

entitled "Synthetic Peptides Representing a T-Cell Epitope as a Carrier Molecule For Conjugate Vaccines"; incorporated herein by reference as if set forth in its entirety. Other suitable carrier proteins include inactivated bacterial toxins such as cholera toxoid (*e.g.*, as described in Int'l Patent Application No. WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial outer membrane proteins such as outer membrane complex c (OMPC), porins, transferrin binding proteins, pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal adhesion protein (PsaA) or *Haemophilus influenzae* protein D also can be used. Other proteins, such as ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or purified protein derivative of tuberculin (PPD) also can be used as carrier proteins.

[0104] Accordingly, in one embodiment, the carrier protein within the immunogenic conjugate of the invention is CRM_{197}, and the CRM_{197} is covalently linked to the capsular polysaccharide via a carbamate linkage, an amide linkage, or both. In some embodiments, the carrier protein within the immunogenic conjugate of the invention is CRM_{197}, and the CRM_{197} is covalently linked to the capsular polysaccharide via a thioether bond. The number of lysine residues in the carrier protein that become conjugated to a capsular polysaccharide can be characterized as a range of conjugated lysines. For example, in a given immunogenic composition, the CRM_{197} may comprise 5 to 15 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Another way to express this parameter is that 12% to 40% of CRM_{197} lysines are covalently linked to the capsular polysaccharide. For example, in a given immunogenic composition, the CRM_{197} may comprise 18 to 22 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Another way to express this parameter is that 40% to 60% of CRM_{197} lysines are covalently linked to the capsular polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} comprises 5 to 15 lysines out of 39 covalently linked to CP8. Another way to express this parameter is that 12% to 40% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP8. In some embodiments, the CRM_{197} comprises 18 to 22 lysines out of 39 covalently linked to CP5. Another way to express this parameter is that 40% to 60% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP5.

[0105] As discussed above, the number of lysine residues in the carrier protein conjugated to the capsular polysaccharide can be characterized as a range of conjugated lysines, which may be expressed as a molar ratio. For example, the molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} in the CP8 immunogenic conjugate can be between about 18:1 to about 22:1. In one embodiment, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} in the CP8 immunogenic conjugate can be between about 15:1 to about 25:1. In one embodiment, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} in the CP8 immunogenic conjugate can be between about 14:1 to about 20:1; about 12:1 to about 18:1; about 10:1 to about 16:1; about 8:1 to about 14:1; about 6:1 to about 12:1; about 4:1 to about 10:1; about 20:1 to about 26:1; about 22:1 to about 28:1; about 24:1 to about 30:1; about 26:1 to about 32:1; about 28:1 to about 34:1; about 30:1 to about 36:1; about 5:1 to about 10:1; about 5:1 to about 20:1; about 10:1 to about 20:1; or about 10:1 to about 30:1. Also, the molar ratio of conjugated lysines to CRM197 in the CP5 immunogenic conjugate can be between about 3:1 and 25:1. In one embodiment, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM197 in the CP5 immunogenic conjugate can be between about 5:1 to about 20:1. In one embodiment, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM197 in the CP5 immunogenic conjugate can be between about 4:1 to about 20:1; about 6:1 to about 20:1; about 7:1 to about 20:1; about 8:1 to about 20:1; about 10:1 to about 20:1; about 11:1 to about 20:1; about 12:1 to about 20:1; about 13:1 to about 20:1; about 14:1 to about 20:1; about 15:1 to about 20:1; about 16:1 to about 20:1; about 17:1 to about 20:1; about 18:1 to about 20:1; about 5:1 to about 18:1; about 7:1 to about 16:1; or about 9:1 to about 14:1.

[0106] Another way to express the number of lysine residues in the carrier protein conjugated to the capsular polysaccharide can be as a range of conjugated lysines. For example, in a given CP8 immunogenic conjugate, the CRM_{197} may comprise 5 to 15 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Alternatively, this parameter can be expressed as a percentage. For example, in a given CP8 immunogenic conjugate, the percentage of conjugated lysines can be between 10% to 50%. In some embodiments, 20% to 50% of lysines can be covalently linked to CP8. Alternatively still, 30% to 50% of CRM_{197} lysines can

be covalently linked to CP8; 10% to 40% of CRM_{197} lysines; 10% to 30% of CRM_{197} lysines; 20% to 40% of CRM_{197} lysines; 25% to 40% of CRM_{197} lysines; 30% to 40% of CRM_{197} lysines; 10% to 30% of CRM_{197} lysines; 15% to 30% of CRM_{197} lysines; 20% to 30% of CRM_{197} lysines; 25% to 30% of CRM_{197} lysines; 10% to 15% of CRM_{197} lysines; or 10% to 12% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP8. Also, in a given CP5 immunogenic conjugate, the CRM_{197} may comprise 18 to 22 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Alternatively, this parameter can be expressed as a percentage. For example, in a given CP5 immunogenic conjugate, the percentage of conjugated lysines can be between 40% to 60%. In some embodiments, 40% to 60% of lysines can be covalently linked to CP5. Alternatively still, 30% to 50% of CRM_{197} lysines can be covalently linked to CP5; 20% to 40% of CRM_{197} lysines; 10% to 30% of CRM_{197} lysines; 50% to 70% of CRM_{197} lysines; 35% to 65% of CRM_{197} lysines; 30% to 60% of CRM_{197} lysines; 25% to 55% of CRM_{197} lysines; 20% to 50% of CRM_{197} lysines; 15% to 45% of CRM_{197} lysines; 10% to 40% of CRM_{197} lysines; 40% to 70% of CRM_{197} lysines; or 45% to 75% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP5.

[0107] The frequency of attachment of the capsular polysaccharide chain to a lysine on the carrier molecule is another parameter for characterizing conjugates of capsule polysaccharides. For example, in one embodiment, at least one covalent linkage between CRM_{197} and polysaccharide occurs for at least every 5 to 10 saccharide repeat units of the capsular polysaccharide. In another embodiment, there is at least one covalent linkage between CRM_{197} and capsular polysaccharide for every 5 to 10 saccharide repeat units; every 2 to 7 saccharide repeat units, every 3 to 8 saccharide repeat units; every 4 to 9 saccharide repeat units; every 6 to 11 saccharide repeat units; every 7 to 12 saccharide repeat units; every 8 to 13 saccharide repeat units; every 9 to 14 saccharide repeat units; every 10 to 15 saccharide repeat units; every 2 to 6 saccharide repeat units, every 3 to 7 saccharide repeat units; every 4 to 8 saccharide repeat units; every 6 to 10 saccharide repeat units; every 7 to 11 saccharide repeat units; every 8 to 12 saccharide repeat units; every 9 to 13 saccharide repeat units; every 10 to 14 saccharide repeat units; every 10 to 20 saccharide repeat units; or every 5 to 10

saccharide repeat units of the capsular polysaccharide. In another embodiment, at least one linkage between CRM_{197} and capsular polysaccharide occurs for every 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 saccharide repeat units of the capsular polysaccharide.

[0108] One embodiment of the invention provides an immunogenic composition comprising any of the immunogenic conjugates comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein described above.

[0109] The term "immunogenic composition" relates to any pharmaceutical composition containing an antigen, *e.g.*, a microorganism or a component thereof, which composition can be used to elicit an immune response in a subject. The immunogenic compositions of the present invention can be used to protect or treat a human susceptible to *S. aureus* infection, by means of administering the immunogenic compositions via a systemic, dermal or mucosal route or be used to generate a polyclonal or monoclonal antibody preparation that could be used to confer passive immunity on another subject. These administrations can include injection via the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes; or via mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory or genitourinary tracts. In one embodiment, intranasal administration is used for the treatment or prevention of nasopharyngeal carriage of *S. aureus*, thus attenuating infection at its earliest stage. Immunogenic compositions may also be used to generate antibodies that are functional as measured by the killing of bacteria in either an animal efficacy model or via an opsonophagocytic killing assay.

[0110] Optimal amounts of components for a particular immunogenic composition can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive one or several booster immunizations adequately spaced.

[0111] The immunogenic compositions of the present invention may also include one or more of the following antigens: ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE MntC/SitC/Saliva Binding Protein, IsdB, IsdA, Opp3a, DltA, HtsA, LtaS, SdrH, SrtA, SpA, SBI, alpha-hemolysin (hla), beta-hemolysin, fibronectin-binding protein A (fnbA), coagulase, map, Panton-Valentine leukocidin (pvl),

gamma-toxin (hlg), ica, immunodominant ABC transporter, RAP, autolysin, laminin receptors, IsaA/PisA, IsaB/PisB , SPOIIIE, SsaA, EbpS, SasF, SasH, EFB (FIB), FnbB, Npase, EBP, bone sialo binding protein II, aureolysin precursor (AUR)/Sepp1, Cna, TSST-1, mecA, dPNAG, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2 HBP, vitronectin binding protein, HarA, Enterotoxin A, Enterotoxin B, Enterotoxin C1, and novel autolysin.

[0112] In one embodiment, the immunogenic compositions of the invention further comprise at least one of an adjuvant, a buffer, a cryoprotectant, a salt, a divalent cation, a non-ionic detergent, an inhibitor of free radical oxidation, a diluent or a carrier. In one embodiment, the adjuvant within the immunogenic composition of the invention is an aluminum-based adjuvant. In one embodiment, the adjuvant is an aluminum-based adjuvant selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide. In one embodiment, the adjuvant is aluminum phosphate.

[0113] An adjuvant is a substance that enhances the immune response when administered together with an immunogen or antigen. A number of cytokines or lymphokines have been shown to have immune modulating activity, and thus may be useful in a manner the same or similar to adjuvants, including, but not limited to, the interleukins 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (*see, e.g.*, US Patent No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 and 18 (and its mutant forms); the interferons-α, β and γ; granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (*see, e.g.*, US Patent No. 5,078,996 and ATCC Accession Number 39900); macrophage colony stimulating factor (M-CSF); granulocyte colony stimulating factor (G-CSF); and the tumor necrosis factors α and β. Still other adjuvants that are useful with the immunogenic compositions described herein include chemokines, including without limitation, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES; adhesion molecules, such as a selectin, *e.g.*, L-selectin, P-selectin and E-selectin; mucin-like molecules, *e.g.*, CD34, GlyCAM-1 and MadCAM-1; a member of the integrin family such as LFA-1, VLA-1, Mac-1 and p150.95; a member of the immunoglobulin superfamily such as PECAM, ICAMs, *e.g.*, ICAM-1, ICAM-2 and ICAM-3, CD2 and LFA-3; co-stimulatory molecules such as B7-1, B7-2, CD40 and CD40L; growth factors including vascular growth factor, nerve growth factor, fibroblast growth factor,

epidermal growth factor, PDGF, BL-1, and vascular endothelial growth factor; receptor molecules including Fas, TNF receptor, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, and DR6; and Caspases, including ICE.

[0114] Suitable adjuvants used to enhance an immune response may further include, without limitation, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A, Corixa; Hamilton, MT), which is described in US Patent No. 4,912,094. Also suitable for use as adjuvants are synthetic lipid A analogs or aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa, and those that are described in US Patent No. 6,113,918. One such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino] ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyoxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl-amino]-b-D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529). This 529 adjuvant is formulated as an aqueous form (AF) or as a stable emulsion (SE).

[0115] Still other adjuvants include muramyl peptides, such as N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanine-2-(1'-2' dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (MTP-PE); oil-in-water emulsions, such as MF59 (US Patent No. 6,299,884) (containing 5% Squalene, 0.5% polysorbate 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA)), and SAF (containing 10% Squalene, 0.4% polysorbate 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP, either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion); incomplete Freund's adjuvant (IFA); aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate; Amphigen; Avridine; L121/squalene; D-lactide-polylactide/glycoside; pluronic polyols; killed *Bordetella*; saponins, such as Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), described in US Patent No. 5,057,540, Iscomatrix® (CSL Limited, Parkville, Australia), described in US Patent No. 5,254,339, and immunostimulating complexes (ISCOMS); *Mycobacterium*

tuberculosis; bacterial lipopolysaccharides; synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (*e.g.*, US Patent No. 6,207,646); IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), described in EP Patent Nos. 1,296,713 and 1,326,634; a pertussis toxin (PT) or mutant thereof, a cholera toxin or mutant thereof (*e.g.*, US Patent Nos. 7,285,281, 7,332,174, 7,361,355 and 7,384,640); or an *E. coli* heat-labile toxin (LT) or mutant thereof, particularly LT-K63, LT-R72 (*e.g.*, US Patent Nos. 6,149,919, 7,115,730 and 7,291,588).

[0116] The immunogenic composition optionally can comprise a pharmaceutically acceptable carrier. The term "pharmaceutically acceptable carrier" means a carrier approved by a regulatory agency of a Federal, a state government, or other regulatory agency, or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans as well as non-human mammals. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the pharmaceutical composition is administered. Water, saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. The formulation should suit the mode of administration.

[0117] The immunogenic compositions of the present invention can further comprise one or more additional "immunomodulators," which are agents that perturb or alter the immune system, such that either up-regulation or down-regulation of humoral and/or cell-mediated immunity is observed. In one embodiment, up-regulation of the humoral and/or cell-mediated arms of the immune system is provided. Examples of certain immunomodulators include, *e.g.*, an adjuvant or cytokine, or Iscomatrix® (CSL Limited; Parkville, Australia), described in US Patent No. 5,254,339 among others. Non-limiting examples of adjuvants that can be used in the immunogenic composition of the present invention include the RIBI adjuvant system (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alum, mineral gels such as aluminum hydroxide gel, oil-in-water emulsions, water-in-oil emulsions such as, *e.g.*, Freund's complete and incomplete adjuvants, Block copolymer (CytRx; Atlanta, GA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge,

MA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), Amphigen® adjuvant, saponin, Quil A or other saponin fraction, monophosphoryl lipid A, and Avridine lipid-amine adjuvant. Non-limiting examples of oil-in-water emulsions useful in the immunogenic composition of the invention include modified SEAM62 and SEAM 1/2 formulations. Modified SEAM62 is an oil-in-water emulsion containing 5% (v/v) squalene (Sigma), 1% (v/v) Span® 85 Detergent (ICI Surfactants), 0.7% (v/v) polysorbate 80 detergent (ICI Surfactants), 2.5% (v/v) ethanol, 200 mcg/ml Quil A, 100 mcg/ml cholesterol, and 0.5% (v/v) lecithin. Modified SEAM 1/2 is an oil-in-water emulsion comprising 5% (v/v) squalene, 1% (v/v) Span® 85 Detergent, 0.7% (v/v) polysorbate 80 detergent, 2.5% (v/v) ethanol, 100 mcg/ml Quil A, and 50 mcg/ml cholesterol. Other "immunomodulators" that can be included in the immunogenic composition include, *e.g.*, one or more interleukins, interferons, or other known cytokines or chemokines. In one embodiment, the adjuvant may be a cyclodextrin derivative or a polyanionic polymer, such as those described in US Patent Nos. 6,165,995 and 6,610,310, respectively. It is to be understood that the immunomodulator and/or adjuvant to be used will depend on the subject to which the immunogenic composition will be administered, the route of injection and the number of injections to be given.

[0044] The immunogenic compositions of the invention may further comprise one or more preservatives in addition to a plurality of staphylococcal capsular polysaccharide-protein conjugates. The FDA requires that biological products in multiple-dose (multi-dose) vials contain a preservative, with only a few exceptions. Vaccine products containing preservatives include vaccines containing benzethonium chloride (anthrax), 2-phenoxyethanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), phenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) and thimerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabies). Preservatives approved for use in injectable drugs include, e.g., chlorobutanol, m-cresol, methylparaben, propylparaben, 2-phenoxyethanol, benzethonium chloride, benzalkonium chloride, benzoic acid, benzyl alcohol, phenol, thimerosal and phenylmercuric nitrate.

[0118] Formulations of the invention may further comprise one or more of a buffer, a salt, a divalent cation, a non-ionic detergent, a cryoprotectant such as a

sugar, and an anti-oxidant such as a free radical scavenger or chelating agent, or any multiple combination thereof. The choice of any one component, e.g., a chelator, may determine whether or not another component (e.g., a scavenger) is desirable. The final composition formulated for administration should be sterile and/or pyrogen free. The skilled artisan may empirically determine which combinations of these and other components will be optimal for inclusion in the preservative containing immunogenic compositions of the invention depending on a variety of factors such as the particular storage and administration conditions required.

[0119] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more physiologically acceptable buffers selected from, but not limited to, Tris (trimethamine), phosphate, acetate, borate, citrate, glycine, histidine and succinate. In certain embodiments, the formulation is buffered to within a pH range of about 6.0 to about 9.0, preferably from about 6.4 to about 7.4.

[0120] In certain embodiments, it may be desirable to adjust the pH of the immunogenic composition or formulation of the invention. The pH of a formulation of the invention may be adjusted using standard techniques in the art. The pH of the formulation may be adjusted to be between 3.0 and 8.0. In certain embodiments, the pH of the formulation may be, or may adjusted to be, between 3.0 and 6.0, 4.0 and 6.0, or 5.0 and 8.0. In other embodiments, the pH of the formulation may be, or may adjusted to be, about 3.0, about 3.5, about 4.0, about 4.5, about 5.0, about 5.5, about 5.8, about 6.0, about 6.5, about 7.0, about 7.5, or about 8.0. In certain embodiments, the pH may be, or may adjusted to be, in a range from 4.5 to 7.5, or from 4.5 to 6.5, from 5.0 to 5.4, from 5.4 to 5.5, from 5.5 to 5.6, from 5.6 to 5.7, from 5.7 to 5.8, from 5.8 to 5.9, from 5.9 to 6.0, from 6.0 to 6.1, from 6.1 to 6.2, from 6.2 to 6.3, from 6.3 to 6.5, from 6.5 to 7.0, from 7.0 to 7.5 or from 7.5 to 8.0. In a specific embodiment, the pH of the formulation is about 5.8.

[0121] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more divalent cations,

including but not limited to $MgCl_2$, $CaCl_2$ and $MnCl_2$, at a concentration ranging from about 0.1 mM to about 10 mM, with up to about 5 mM being preferred.

[0122] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more salts, including but not limited to sodium chloride, potassium chloride, sodium sulfate, and potassium sulfate, present at an ionic strength which is physiologically acceptable to the subject upon parenteral administration and included at a final concentration to produce a selected ionic strength or osmolarity in the final formulation. The final ionic strength or osmolality of the formulation will be determined by multiple components (e.g., ions from buffering compound(s) and other non-buffering salts. A preferred salt, NaCl, is present from a range of up to about 250 mM, with salt concentrations being selected to complement other components (e.g., sugars) so that the final total osmolarity of the formulation is compatible with parenteral administration (e.g., intramuscular or subcutaneous injection) and will promote long term stability of the immunogenic components of the immunogenic composition formulation over various temperature ranges. Salt-free formulations will tolerate increased ranges of the one or more selected cryoprotectants to maintain desired final osmolarity levels.

[0123] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more cryoprotectants selected from but not limited to disaccharides (e.g., lactose, maltose, sucrose or trehalose) and polyhydroxy hydrocarbons (e.g., dulcitol, glycerol, mannitol and sorbitol).

[0124] In certain embodiments, the osmolarity of the formulation is in a range of from about 200 mOs/L to about 800 mOs/L, with a preferred range of from about 250 mOs/L to about 500 mOs/L, or about 300 mOs/L - about 400 mOs/L. A salt-free formulation may contain, for example, from about 5% to about 25% sucrose, and preferably from about 7% to about 15%, or about 10% to about 12% sucrose. Alternatively, a salt-free formulation may contain, for example, from about 3% to about 12% sorbitol, and preferably from about 4% to 7%, or about 5% to about 6% sorbitol. If salt such as sodium chloride is added, then the effective range of

sucrose or sorbitol is relatively decreased. These and other such osmolality and osmolarity considerations are well within the skill of the art.

[0125] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more free radical oxidation inhibitors and/or chelating agents. A variety of free radical scavengers and chelators are known in the art and apply to the formulations and methods of use described herein. Examples include but are not limited to ethanol, EDTA, a EDTA/ethanol combination, triethanolamine, mannitol, histidine, glycerol, sodium citrate, inositol hexaphosphate, tripolyphosphate, ascorbic acid/ascorbate, succinic acid/succinate, malic acid/malcate, desferal, EDDHA and DTPA, and various combinations of two or more of the above. In certain embodiments, at least one non-reducing free radical scavenger may be added at a concentration that effectively enhances long term stability of the formulation. One or more free radical oxidation inhibitors/chelators may also be added in various combinations, such as a scavenger and a divalent cation. The choice of chelator will determine whether or not the addition of a scavenger is needed.

[0126] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more non-ionic surfactants, including but not limited to polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters, Polysorbate-80 (Tween 80), Polysorbate-60 (Tween 60), Polysorbate-40 (Tween 40) and Polysorbate-20 (Tween 20), polyoxyethylene alkyl ethers, including but not limited to Brij 58, Brij 35, as well as others such as Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 and the Pluronic series of non-ionic surfactants (e. g. , Pluronic 121), with preferred components Polysorbate-80 at a concentration from about 0.001% to about 2% (with up to about 0.25% being preferred) or Polysorbate-40 at a concentration from about 0.001% to 1% (with up to about 0.5% being preferred).

[0127] In certain embodiments, a formulation of the invention comprises one or more additional stabilizing agents suitable for parenteral administration, e.g., a reducing agent comprising at least one thiol (-SH) group (e.g., cysteine, N-acetyl cysteine, reduced glutathione, sodium thioglycolate, thiosulfate, monothioglycerol, or mixtures thereof). Alternatively or optionally, preservative-containing

immunogenic composition formulations of the invention may be further stabilized by removing oxygen from storage containers, protecting the formulation from light (e.g., by using amber glass containers).

[0128] Preservative-containing immunogenic composition formulations of the invention may comprise one or more pharmaceutically acceptable carriers or excipients, which includes any excipient that does not itself induce an immune response. Suitable excipients include but are not limited to macromolecules such as proteins, saccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, sucrose (Paoletti et al, 2001, *Vaccine*, 19:2118), trehalose, lactose and lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes). Such carriers are well known to the skilled artisan. Pharmaceutically acceptable excipients are discussed, e.g., in Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN:0683306472.

[0129] Compositions of the invention may be lyophilized or in aqueous form, i.e. solutions or suspensions. Liquid formulations may advantageously be administered directly from their packaged form and are thus ideal for injection without the need for reconstitution in aqueous medium as otherwise required for lyophilized compositions of the invention.

[0130] Direct delivery of immunogenic compositions of the present invention to a subject may be accomplished by parenteral administration (intramuscularly, intraperitoneally, intradermally, subcutaneously, intravenously, or to the interstitial space of a tissue); or by rectal, oral, vaginal, topical, transdermal, intranasal, ocular, aural, pulmonary or other mucosal administration. In a preferred embodiment, parenteral administration is by intramuscular injection, e.g., to the thigh or upper arm of the subject. Injection may be via a needle (e.g. a hypodermic needle), but needle free injection may alternatively be used. A typical intramuscular dose is 0.5mL. Compositions of the invention may be prepared in various forms, e.g., for injection either as liquid solutions or suspensions. In certain embodiments, the composition may be prepared as a powder or spray for pulmonary administration, e.g. in an inhaler. In other embodiments, the composition may be prepared as a suppository or pessary, or for nasal, aural or ocular administration, e.g. as a spray, drops, gel or powder.

[0131] The amount of conjugate in each immunogenic composition dose is selected as an amount that induces an immunoprotective response without significant, adverse effects. Such amount can vary depending upon the staphylococcal serotype. Generally, each dose will comprise 0.1 to 100 µg of polysaccharide, particularly 0.1 to 10 µg, and more particularly 1 to 5 µg.

[0132] Optimal amounts of components for a particular immunogenic composition may be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive one or several booster immunizations adequately spaced.

Packaging and Dosage Forms

[0133] Immunogenic compositions of the invention may be packaged in unit dose or multi-dose form (e.g. 2 doses, 4 doses, or more). For multi-dose forms, vials are typically but not necessarily preferred over pre-filled syringes. Suitable multi-dose formats include but are not limited to: 2 to 10 doses per container at 0.1 to 2 mL per dose. In certain embodiments, the dose is a 0.5 mL dose. See, e.g., International Patent Application WO2007/127668, which is incorporated by reference herein.

Compositions may be presented in vials or other suitable storage containers, or may be presented in pre-filled delivery devices, e.g., single or multiple component syringes, which may be supplied with or without needles. A syringe typically but need not necessarily contains a single dose of the preservative-containing immunogenic composition of the invention, although multi-dose, pre-filled syringes are also envisioned. Likewise, a vial may include a single dose but may alternatively include multiple doses.

[0134] Effective dosage volumes can be routinely established, but a typical dose of the composition for injection has a volume of 0.5 mL. In certain embodiments, the dose is formulated for administration to a human subject. In certain embodiments, the dose is formulated for administration to an adult, teen, adolescent, toddler or infant (i.e., no more than one year old) human subject and may in preferred embodiments be administered by injection.

[0135] Liquid immunogenic compositions of the invention are also suitable for reconstituting other immunogenic compositions which are presented in lyophilized

form. Where an immunogenic composition is to be used for such extemporaneous reconstitution, the invention provides a kit with two or more vials, two or more ready-filled syringes, or one or more of each, with the contents of the syringe being used to reconstitute the contents of the vial prior to injection, or vice versa.

[0136] Alternatively, immunogenic compositions of the present invention may be lyophilized and reconstituted, e.g., using one of a multitude of methods for freeze drying well known in the art to form dry, regular shaped (e.g., spherical) particles, such as micropellets or microspheres, having particle characteristics such as mean diameter sizes that may be selected and controlled by varying the exact methods used to prepare them. The immunogenic compositions may further comprise an adjuvant which may optionally be prepared with or contained in separate dry, regular shaped (e.g., spherical) particles such as micropellets or microspheres. In such embodiments, the present invention further provides an immunogenic composition kit comprising a first component that includes a stabilized, dry immunogenic composition, optionally further comprising one or more preservatives of the invention, and a second component comprising a sterile, aqueous solution for reconstitution of the first component. In certain embodiments, the aqueous solution comprises one or more preservatives, and may optionally comprise at least one adjuvant (see, e.g., WO2009/109550 (incorporated herein by reference).

[0137] In yet another embodiment, a container of the multi-dose format is selected from one or more of the group consisting of, but not limited to, general laboratory glassware, flasks, beakers, graduated cylinders, fermentors, bioreactors, tubings, pipes, bags, jars, vials, vial closures (e.g., a rubber stopper, a screw on cap), ampoules, syringes, dual or multi-chamber syringes, syringe stoppers, syringe plungers, rubber closures, plastic closures, glass closures, cartridges and disposable pens and the like. The container of the present invention is not limited by material of manufacture, and includes materials such as glass, metals (e.g., steel, stainless steel, aluminum, etc.) and polymers (e.g., thermoplastics, elastomers, thermoplastic-elastomers). In a particular embodiment, the container of the format is a 5 mL Schott Type 1 glass vial with a butyl stopper. The skilled artisan will appreciate that the format set forth above is by no means an exhaustive list, but

merely serve as guidance to the artisan with respect to the variety of formats available for the present invention. Additional formats contemplated for use in the present invention may be found in published catalogues from laboratory equipment vendors and manufacturers such as United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Methods for Making Immunogenic Conjugates

[0138] The present invention also includes methods of making the immunogenic conjugates described herein. Methods for making the immunogenic conjugates of the invention involve covalent conjugation of the capsular polysaccharides with the carrier proteins using conjugation chemistry involving CDI (1,1-carbonyldiimidazole), CDT (1,1-carboyl-di-1,2,4-triazole) or PDPH (3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide).

[0139] Accordingly, one embodiment of the invention provides a CDT-based method of making an immunogenic conjugate comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of: a) compounding a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with imidazole or triazole to produce a compounded polysaccharide; b) reacting the compounded polysaccharide with CDT in an organic solvent and about 0.1% to about 0.3% w/v water to produce an activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide; c) purifying the activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide to produce a purified activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide; d) reacting the purified activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with a carrier protein in the organic solvent to produce a serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate; and e) hydrolyzing the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups; whereby an immunogenic conjugate comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein is produced. In one embodiment, prior to step (d), the purified activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide is compounded with a carrier protein.

[0140] In one embodiment of the invention, another CDT-based method of making an immunogenic conjugate is provided comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of: a) compounding a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular

polysaccharide with imidazole or triazole to produce a compounded polysaccharide; b) reacting the compounded polysaccharide with CDT in an organic solvent and about 0.1% to about 0.3% w/v water to produce an activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide; c) reacting the activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with a carrier protein in the organic solvent to produce a serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate; and d) hydrolyzing the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups; whereby an immunogenic conjugate comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein is produced.

[0141] In one embodiment, the organic solvent within the CDT-based methods of making an immunogenic conjugate is a polar aprotic solvent. In one embodiment, the organic solvent is a polar aprotic solvent selected from the group consisting of dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide, *N*-methyl-2-pyrrolidone, and hexamethylphosphoramide (HMPA). In one embodiment, the organic solvent is DMSO.

[0142] In one embodiment, the step of reacting the compounded polysaccharide with CDT within the CDT-based methods of making an immunogenic conjugate comprises providing about 20-fold molar excess of CDT compared to the polysaccharide.

In one embodiment, the step of purifying the activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide within the CDT-based methods of making an immunogenic conjugate comprises diafiltration.

[0143] In one embodiment, the carrier protein within the CDT-based methods of making an immunogenic conjugate is CRM_{197}. In one embodiment, the activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide within the methods of making an immunogenic conjugate is reacted with the CRM_{197} in a ratio by weight of about 1:1.

[0144] In one embodiment, the step of hydrolyzing the serotype 5 or 8 polysaccharide:carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups within the CDT-based methods of making an immunogenic conjugate comprises dilution into a buffer and maintaining a pH of about 8.8 to about 9.2 for at least 4

hours at about 20°C to about 26°C. In one embodiment, the step of hydrolyzing the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate comprises dilution into a buffer and maintaining a pH of about 9.0 for at least 4 hours at about 23°C.

[0145] In one embodiment, the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate produced according to the CDT-based methods of making an immunogenic conjugate is purified. In one embodiment, purification of the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate comprises diafiltration.

[0146] In one embodiment, prior to reacting the compounded polysaccharide with CDT within the CDT-based methods of making an immunogenic conjugate, the compounded serotype 5 or 8 polysaccharide is lyophilized and resuspended. In one embodiment, both the compounded polysaccharide and the carrier protein are separately lyophilized and re-suspended prior to reacting the compounded polysaccharide with CDT. In one embodiment, the lyophilized compounded polysaccharide and/or the lyophilized carrier protein are resuspended in an organic solvent. In one embodiment, the organic solvent is DMSO.

[0147] In one embodiment, prior to reacting the activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide compounded with a carrier protein within the CDT-based method of making an immunogenic conjugate, the purified activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide and the carrier protein are separately lyophilized and re-suspended. In one embodiment, the carrier protein is CRM_{197} and prior to lyophilization the CRM_{197} is diafiltered against NaCl. In one embodiment, prior to lyophilization the CRM_{197} is diafiltered against NaCl and the w/w ratio of NaCl/CRM is adjusted to about 0.5 to about 1.5.

[0148] One embodiment of the present invention provides a PDPH-based method of making an immunogenic conjugate comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of: a) reacting a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with PDPH and a carbodiimide in an organic solvent to produce a PDPH-linked polysaccharide; b) reacting the PDPH-linked polysaccharide with a reducing agent to produce an activated polysaccharide; c) purifying the activated serotype 5 or 8

capsular polysaccharide to produce a purified activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide; d) reacting a carrier protein with a bromoacetic acid in an organic solvent to produce an activated carrier protein; e) purifying the activated carrier protein to produce a purified activated carrier protein; f) reacting the purified activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with the purified activated carrier protein to produce a serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate; and g) hydrolyzing the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups; whereby an immunogenic conjugate comprising a *S. aureus* serotype 5 or 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein is produced.

[0149] In one embodiment, the bromoacetic acid used within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate is a *N*-hydroxysuccinimide ester of bromoacetic acid (BAANS). In one embodiment, the carrier protein used within the PDPH-based methods of the invention is CRM_{197} and the BAANS is added in a CRM_{197}:BAANS ratio by weight of about 1:0.1 to about 1:0.5.

[0150] In one embodiment, the organic solvent within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate is a polar aprotic solvent. In one embodiment, the organic solvent is a polar aprotic solvent selected from the group consisting of DMSO, DMF, dimethylacetamide, *N*-methyl-2-pyrrolidone, and HMPA. In one embodiment, the organic solvent is DMSO.

In one embodiment, the carbodiimide used within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate is 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC). In one embodiment, the step of reacting the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with PDPH and EDAC in an organic solvent comprises maintaining a polysaccharide:PDPH:EDAC ratio by weight of about 1:5:3.

[0151] In one embodiment, the reducing agent used within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate is dithiothreitol (DTT).

[0152] In one embodiment, the steps of purifying the activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide and purifying the carrier protein within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate each comprise diafiltration.

[0153] In one embodiment, the carrier protein within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate is CRM_{197}. In one embodiment, the

activated serotype 5 or 8 polysaccharide within the methods of making an immunogenic conjugate is reacted with the CRM_{197} in a ratio by weight of about 1:1.

[0154] In one embodiment, the step of hydrolyzing the serotype 5 or 8 polysaccharide:carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate comprises the addition of cysteamine hydrochloride.

[0155] In one embodiment, the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate produced according to the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate is purified. In one embodiment, purification of the serotype 5 or 8 capsular polysaccharide:carrier protein conjugate comprises diafiltration.

[0156] In one embodiment, prior to reacting the purified activated serotype 5 or 8 capsular polysaccharide with the purified activated carrier protein within the PDPH-based methods of making an immunogenic conjugate, both the purified activated polysaccharide and the purified activated carrier protein are separately lyophilized and re-suspended. In one embodiment, the lyophilized activated polysaccharide and/or the lyophilized activated carrier protein are resuspended in an organic solvent. In one embodiment, the organic solvent is DMSO.

[0157] As used herein, "lyophilization" means a dehydration process in which the bacterial capsular polysaccharide is frozen while the surrounding pressure is reduced in the presence of enough heat to allow frozen water to sublime directly from a solid phase to gas phase. Any method known in the art for lyophilizing polysaccharides can be used. *See, e.g.*, Harris & Angal (1989) "Protein Purification Methods," In: Kennedy & Cabral, eds. "Recovery Processes for Biological Materials" (John Wiley & Sons; 1993); US Patent No. 4,134,214; and Int'l Patent Application Publication No. WO 2003/086471; each of which is incorporated herein by reference as if set forth in its entirety. Optionally, a cryoprotectant can be included during lyophilization, such as for example sucrose, glucose, lactose, trehalose, arabinose, xylose, galactose, sorbitol or mannitol.

[0158] As used herein, "activate" and "activation" means that a bacterial capsular polysaccharide or carrier protein is modified in such a way that it is rendered

amenable to conjugation (*i.e.*, at least one moiety must be rendered capable of covalently bonding to the carrier molecule). For example, with respect to CDT-based conjugation methods of the present invention, the polysaccharide is activated in a low moisture environment (*e.g.*, in DMSO) to form triazole carbamate moieties with available hydroxyls and acyltriazole moieties with carboxylic acids. Activated polysaccharides may then be reacted with CRM_{197} protein, which leads to the nucleophilic displacement of the triazole by lysine residues within CRM_{197} and formation of a carbamate linkage (for activated hydroxyls) and the amide linkage (for activated carboxylic acids). By contrast, with respect to the PDPH-based conjugation methods of the present invention, both the carrier proteins and the polysaccharides are activated prior to conjugation: 1) activation of CRM_{197} involves introducing bromoacetyl groups into the CRM_{197} protein by reaction of amine groups with the N-hydroxysuccimide ester of bromoacetic acid; and 2) activation of polysaccharide involves coupling the carbodiimide-activated carboxylate groups of N-acetylmannosaminouronic acid in the polysaccharide to the hydrazide group of the sulfhydryl-reactive hydrazide heterobifunctional linker PDPH, followed by reduction with DTT. Activated polysaccharides may then be reacted with activated carrier protein such that thiols of PDPH-thiolated polysaccharides react with bromoacetyl groups of activated carrier protein resulting in a covalent thioether linkage formed by bromide displacement.

[0159] According to the methods of the invention, the capsular polysaccharides, carrier proteins, and/or polysaccharide-protein conjugates may be purified. Any method known in the art for purifying polysaccharides or proteins can be used, such as concentration/diafiltration, precipitation/elution, column chromatography and depth filtration. *See, e.g.*, Farrés *et al.* (1996) *Biotechnol. Tech.* 10:375-380; Gonçalves *et al.* In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (Antonio Mendez Vilas, ed. 1st ed. Badajoz, Espanha: Formatex; 2007. pp.450-457); Tanizaki *et al.* (1996) *J. Microbiol. Methods* 27:19-23; and US Patent No. 6,146,902; and US Patent Application Publication No. 2008/0286838; each of which is incorporated herein by reference as if set forth in its entirety.

[0160] As used herein, the term "isolated" or "purified" means that the material is removed from its original environment (*e.g.*, the natural environment if it is naturally occurring or from its host organism if it is a recombinant entity, or taken from one environment to a different environment). For example, an isolated polysaccharide, peptide or protein is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized or otherwise present in a mixture as part of a chemical reaction. In the present invention, the protein or polysaccharide can be isolated from the bacterial cell or from cellular debris, so that they are provided in a form useful in the manufacture of an immunogenic composition. The term "isolated" or "isolating" may include purifying, or purification, including for example, the methods of purification of the capsular polysaccharides, as described herein. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of a polysaccharide/polypeptide/protein in which the polysaccharide/polypeptide/protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, a polypeptide/protein, polysaccharide, or conjugate that is substantially free of cellular material or other compounds includes preparations of the polypeptide/protein, polysaccharide, or conjugate having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5% or 1% (by dry weight) of contaminating protein, polysaccharide, or other compounds. When the polypeptide/protein is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, *i.e.*, culture medium represents less than about 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, or 1% of the volume of the protein preparation. When polypeptide/protein or polysaccharide is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, *i.e.*, it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein or polysaccharide. Accordingly, such preparations of the polypeptide/protein or polysaccharide have less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, or 1% (by dry weight) of chemical precursors or compounds other than polypeptide/protein or polysaccharide fragment of interest.

[0161] Immunogenic conjugates produced by any of the methods described herein may be stored in water or a low ionic strength neutral pH buffer or lyophilized into a dry powder.

Methods for Inducing an Immune Response and Protecting Against S. Aureus Infection

[0162] The present invention also includes methods of use for immunogenic compositions described herein. For example, one embodiment of the invention provides a method of inducing an immune response against *S. aureus* comprising administering to a subject an immunogenic amount of any of the immunogenic compositions described herein. One embodiment of the invention provides a method of protecting a subject against an infection with *S. aureus*, or a method of preventing infection with *S. aureus*, or a method of reducing the severity of or delaying the onset of at least one symptom associated with an infection caused by *S. aureus*, the methods comprising administering to a subject an immunogenic amount of any of the immunogenic compositions described herein. One embodiment of the invention provides a method of treating or preventing a Staphylococcal infection, disease or condition associated with a *Staphylococcus sp.* in a subject, the method comprising the step of administering a therapeutically or prophylactically effective amount of an immunogenic composition described herein to the subject. In some embodiments, the method of treating or preventing a Staphylococcal infection, disease or conditions comprises human, veterinary, animal, or agricultural treatment. Another embodiment provides a method of treating or preventing a Staphylococcal infection, disease or condition associated with a *Staphylococcus sp.* in a subject, the method comprising generating a polyclonal or monoclonal antibody preparation from the immunogenic composition described herein, and using said antibody preparation to confer passive immunity to the subject. One embodiment of the invention provides a method of preventing a Staphylococcal infection in a subject undergoing a surgical procedure, the method comprising the step of administering a prophylactically effective amount of an immunogenic composition described herein to the subject prior to the surgical procedure.

[0163] An "immune response" to an antigen or immunogenic composition is the development in a subject of a humoral and/or a cell-mediated immune response to molecules present in the antigen or vaccine composition of interest. For purposes of the present invention, a "humoral immune response" is an antibody-mediated immune response and involves the induction and generation of antibodies that recognize and bind with some affinity for the antigen in the immunogenic composition of the invention, while a "cell-mediated immune response" is one mediated by T-cells and/or other white blood cells. A "cell-mediated immune response" is elicited by the presentation of antigenic epitopes in association with Class I or Class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC), CD1 or other non-classical MHC-like molecules. This activates antigen-specific CD4+ T helper cells or CD8+ cytotoxic T lymphocyte cells ("CTLs"). CTLs have specificity for peptide antigens that are presented in association with proteins encoded by classical or non-classical MHCs and expressed on the surfaces of cells. CTLs help induce and promote the intracellular destruction of intracellular microbes, or the lysis of cells infected with such microbes. Another aspect of cellular immunity involves an antigen-specific response by helper T-cells. Helper T-cells act to help stimulate the function, and focus the activity of, nonspecific effector cells against cells displaying peptide or other antigens in association with classical or non-classical MHC molecules on their surface. A "cell-mediated immune response" also refers to the production of cytokines, chemokines and other such molecules produced by activated T-cells and/or other white blood cells, including those derived from CD4+ and CD8+ T-cells. The ability of a particular antigen or composition to stimulate a cell-mediated immunological response may be determined by a number of assays, such as by lymphoproliferation (lymphocyte activation) assays, CTL cytotoxic cell assays, by assaying for T-lymphocytes specific for the antigen in a sensitized subject, or by measurement of cytokine production by T cells in response to re-stimulation with antigen. Such assays are well known in the art. *See, e.g.*, Erickson *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:4189-4199; and Doe *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2369-2376.

[0164] As used herein, "treatment" (including variations thereof, *e.g.*, "treat" or "treated") means any one or more of the following: (i) the prevention of infection

or re-infection, as in a traditional vaccine, (ii) the reduction in the severity of, or, in the elimination of symptoms, and (iii) the substantial or complete elimination of the pathogen or disorder in question. Hence, treatment may be effected prophylactically (prior to infection) or therapeutically (following infection). In the present invention, prophylactic treatment is the preferred mode. According to a particular embodiment of the present invention, compositions and methods are provided that treat, including prophylactically and/or therapeutically immunize, a host animal against a microbial infection (*e.g.*, a bacterium such as *Staphylococcus*). The methods of the present invention are useful for conferring prophylactic and/or therapeutic immunity to a subject. The methods of the present invention can also be practiced on subjects for biomedical research applications.

[0165] As used herein, "mammal" means a human or non-human animal. More particularly, mammal refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports and pet companion animals such as a household pet and other domesticated animal including, but not limited to, cattle, sheep, ferrets, swine, horses, rabbits, goats, dogs, cats, and the like. Preferred companion animals are dogs and cats. Preferably, the mammal is human.

[0166] An "immunogenic amount," and "immunologically effective amount," both of which are used interchangeably herein, refers to the amount of antigen or immunogenic composition sufficient to elicit an immune response, either a cellular (T-cell) or humoral (B-cell or antibody) response, or both, as measured by standard assays known to one skilled in the art.

[0167] The amounts of a particular conjugate in a composition is generally calculated based on total polysaccharide, conjugated and non-conjugated for that conjugate. For example, a CP5 conjugate with 20% free polysaccharide will have about 80 mcg of conjugated CP5 polysaccharide and about 20 mcg of non-conjugated CP5 polysaccharide in a 100 mcg CP5 polysaccharide dose. The protein contribution to the conjugate is usually not considered when calculating the dose of a conjugate. The amount of conjugate can vary depending upon the staphylococcal serotype. Generally, each dose will comprise 0.1 to 100 mcg of polysaccharide, particularly 0.1 to 10 mcg, and more particularly 1 to 10 mcg. The "immunogenic amount" of the different polysaccharide components in the

immunogenic composition, may diverge and each may comprise 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, or about 100 mcg of any particular polysaccharide antigen.

[0168] *S. aureus* "invasive disease" is the isolation of bacteria from a normally sterile site, where there is associated clinical signs/symptoms of disease. Normally sterile body sites include blood, CSF, pleural fluid, pericardial fluid, peritoneal fluid, joint/synovial fluid, bone, internal body site (lymph node, brain, heart, liver, spleen, vitreous fluid, kidney, pancreas, ovary) or other normally sterile sites. Clinical conditions characterizing invasive diseases include bacteremia, pneumonia, cellulitis, osteomyelitis, endocarditis, septic shock and more.

[0169] The effectiveness of an antigen as an immunogen, can be measured either by proliferation assays, by cytolytic assays, such as chromium release assays to measure the ability of a T-cell to lyse its specific target cell, or by measuring the levels of B-cell activity by measuring the levels of circulating antibodies specific for the antigen in serum. An immune response may also be detected by measuring the serum levels of antigen specific antibody induced following administration of the antigen, and more specifically, by measuring the ability of the antibodies so induced to enhance the opsonophagocytic ability of particular white blood cells, as described herein. The level of protection of the immune response may be measured by challenging the immunized host with the antigen that has been administered. For example, if the antigen to which an immune response is desired is a bacterium, the level of protection induced by the immunogenic amount of the antigen is measured by detecting the percent survival or the percent mortality after challenge of the animals with the bacterial cells. In one embodiment, the amount of protection may be measured by measuring at least one symptom associated with the bacterial infection, *e.g.*, a fever associated with the infection. The amount of each of the antigens in the multi-antigen or multi-component vaccine or immunogenic compositions will vary with respect to each of the other components and can be determined by methods known to the skilled artisan. Such methods would include procedures for measuring immunogenicity and/ or *in vivo* efficacy.

In certain embodiments, the term "about" means within 20%, preferably within 10%, and more preferably within 5%.

[0170] The invention further provides antibodies and antibody compositions which bind specifically and selectively to the serotype 5 or 8 capsular polysaccharides or immunogenic conjugates of the present invention. In some embodiments, antibodies are generated upon administration to a subject of the serotype 5 or 8 capsular polysaccharides or immunogenic conjugates of the present invention. In some embodiments, the invention provides purified or isolated antibodies directed against one or more of the serotype 5 or 8 capsular polysaccharides or immunogenic conjugates of the present invention. In some embodiments, the antibodies of the present invention are functional as measured by killing bacteria in either an animal efficacy model or via an opsonophagocytic killing assay. In some embodiments, the antibodies of the invention confer passive immunity to a subject. The present invention further provides polynucleotide molecules encoding an antibody or antibody fragment of the invention, and a cell, cell line (such as hybridoma cells or other engineered cell lines for recombinant production of antibodies) or a transgenic animal that produces an antibody or antibody composition of the invention, using techniques well-known to those of skill in the art.

[0171] Antibodies or antibody compositions of the invention may be used in a method of treating or preventing a Staphylococcal infection, disease or condition associated with a *Staphylococcus sp.* in a subject, the method comprising generating a polyclonal or monoclonal antibody preparation, and using said antibody or antibody composition to confer passive immunity to the subject. Antibodies of the invention may also be useful for diagnostic methods, e.g., detecting the presence of or quantifying the levels of CP5, CP8 or a conjugate thereof.

[0172] Several animal models known in the art may be used to assess the efficacy of any one of the immunogenic compositions described herein. For example:

[0173] Passive Murine Sepsis Model: Mice are passively immunized intraperitoneally (i.p.) with immune IgG or monoclonal antibody. The mice are

challenged 24 hours later with a lethal dose of *S. aureus*. The bacterial challenge is administered intravenously (i.v. or i.p.) ensuring that any survival could be attributed to the specific *in vivo* interaction of the antibody with the bacteria. The bacterial challenge dose is determined to be the dose required to achieve lethal sepsis of approximately 20% of the un-immunized control mice. Statistical evaluation of survival studies can be carried out by Kaplan-Meier analysis.

[0174] Active Immunization and Challenge Model: In this model, mice are actively immunized subcutaneously (s.c.) with a target antigen at 0, 3 and 6 weeks (or a similar schedule known to those skilled in the art) and challenged with *S. aureus* at week 8 (or other similar schedule known to those skilled in the art) by the intravenous or intraperitoneal route. The bacterial challenge dose is calibrated to achieve approximately 20% survival in the control group over a 14 day period. Statistical evaluation of survival studies can be carried out by Kaplan-Meier analysis.

[0175] Passive Infectious Endocarditis Model: A passive immunization model for infectious endocarditis (IE) caused by *S. aureus* has previously been used to show that ClfA can induce protective immunity. *See*, Vernachio *et al.* (2006) *Antmicro. Agents & Chemo.* 50:511-518. In this model of IE, rabbits or rats are used to simulate clinical infections that include a central venous catheter, bacteremia, and hematogenous seeding to distal organs. Catheterized rabbits or rats with sterile aortic valve vegetations are administered a single intravenous injection of a monoclonal or polyclonal antibody specific for the target antigen. After 24 hours, the animals are challenged i.v. with heterologous staphylococcal strains or a MRSA strain. Then 48 hours after challenge, cardiac vegetations, kidneys and blood are harvested and cultured. The frequency of staphylococcal infection in cardiac valve vegetations, kidneys, and blood is then measured. In one study, when animals were challenged with either MRSE ATCC 35984 or MRSA PFESA0003, significant reductions in infection rate were shown using either the polyclonal antibody preparation or the monoclonal antibody to ClfA. *See*, Vernachio *et al.*, *supra*.

[0176] Passive Infectious Endocarditis Model: The infectious endocarditis model has also been adapted for active immunization studies. Rabbits or rats are

immunized intramuscularly (i.m.) with target antigen and challenged with *S. aureus* two weeks later via the i.v. route.

[0177] Pyelonephritis Model: In the pyelonephritis model, mice are immunized on weeks 0, 3 and 6 (or a similar schedule known to those skilled in the art) with the target antigens. On week 8, the animals are challenged by, *e.g.*, i.p. injection of, e.g., 1.7 x 10^8 cfu *S. aureus* PFESA0266. After 48 hours, the kidneys and/or other tissues are harvested and cultured. Finally, colony forming units of challenge bacteria are enumerated in the kidneys and/or other tissues. This model evaluates systemic dissemination in the animal.

Monitoring functional antibodies using opsonophagocytic killing assays

[0178] Differentiated effector cells from a cell line (e.g. HL60s) or polymorphonuclear cells (PMNs) isolated from donor human blood using LYMPHOLYTE®-poly solution (Cedarlane laboratories limited, Ontario, Canada) as per manufacturer's protocol can be used for this assay. Effector cells were resuspended in assay buffer (Modified Eagle's media containing 1% bovine serum albumin) at approximately 2 X 10^7 cells/ml concentration and placed in 37° C incubator until ready to use. *S. aureus* strain PFESA0266 was grown overnight on tryptic soy agar plates. Bacterial cells were scraped, washed twice and resuspended in assay buffer containing 5% glycerol to an OD_{600} = 1, which equals to approximately 5 X 10^8 cfu/ml concentration. One ml aliquots of the bacterial suspension were frozen and stored at -40°C until ready to use. Frozen bacterial suspension were thawed and adjusted to a concentration of 10^6 cfu/ml in assay buffer and placed on ice. The assay was performed using a sterile 96 deep well 1 ml polypropylene plates. Two fold serial dilutions of antibody samples (50 µl) were prepared and followed by addition of 300 µl of assay buffer to the antibody mix. Bacteria were added (50 µl) to the plates and placed on a rotary shaker at 4 °C for 30 minutes. The opsonization step was followed by addition of 50 µl of human complement (1% final concentration). Finally, 50 µl of effector cells (10^7 cells/ml concentration) were added to the plate and the suspension mixed well by repeated pipetting. A 50µl aliquot of the suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, vortexed to minimize bacterial clumping and plated

on tryptic soy agar in duplicate. The assay plate was incubated at 37°C for 1 hour with continuous mixing using rotisserie style shaker. At the end of the incubation a 50µl aliquot of suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, mixed by vortexing to minimize bacterial clumping and plated on tryptic soy agar in duplicate. The percentage killing was calculated by determining the ratio of the number of cfu surviving at 60 minutes in wells with bacteria, antibodies, complement and effector cells to the number of cfu surviving in tubes lacking antibodies but containing bacteria, complement and effector cells. Controls containing bacteria, complement, and sera were included to adjust for any reduction in cfu due to clumping.

Complement adsorption

[0179] Serum from human donors adsorbed against *S. aureus* strains PFESA0266, PFESA0286 and PFESA0270 can be used as a source of complement in the assay. *S. aureus* strains were grown overnight on TSA plates at 37°C. Cells were scraped from the plate and resuspended in sterile PBS. Bacterial cells were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at 4°C and cell pellet was resuspended in human serum for adsorption. Serum was incubated with bacteria on a nutator at 4°C for 30 minutes. Cells were centrifuged, serum transferred to another tube containing bacteria and the adsorption step repeated again for 30 minutes. Finally, the cells were centrifuged and the serum passed through a 0.2 micron filter before 0.5 ml aliquots were frozen down in liquid nitrogen.

Method II - OPA using HL-60 cells

[0180] HL-60 cells were differentiated according to S. Romero-Steiner, et al., Clin Diagn Lab Immunol 4 (4) (1997), pp. 415–422. Harvested HL-60 cells were resuspended in assay buffer (Modified Eagle's media containing 1% bovine serum albumin) at approximately 10^8 cells/ml and placed in 37 °C incubator until ready to use. *S. aureus* was grown overnight on tryptic soy agar plates. Bacterial cells were scraped, washed twice and resuspended in assay buffer containing 5% glycerol to an OD_{600} = 1, which equals to approximately 5 X 10^8cfu/ml. One ml aliquots of the bacterial suspension were frozen and stored at -40°C until ready to

use. Frozen bacterial suspension were thawed and adjusted to a concentration of 10^6 cfu/ml in assay buffer and placed on ice. The assay was performed using a sterile 96 deep well 1 ml polypropylene plates. Two fold serial dilutions of monoclonal antibody samples (25µl) were prepared and followed by addition of 150 µl of assay buffer to the antibody suspension. Bacteria were added (25µl) to the plates and placed on a rotary shaker at 4 °C for 30 minutes followed by addition of 25 µl of human complement (1% final concentration). Finally, 25µl of HL-60 cells (10^7 cells/ml) were added to the plate and the suspension mixed well by repeated pipetting. A 25µl aliquot of the suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, mixed by vortexing to minimize bacterial clumping and plated on tryptic soy agar in duplicates. The assay plate was incubated at 37°C for 1 hour with continuous mixing using rotisseric style shaker. At the end of incubation a 25µl aliquot of suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, mixed by vortexing to and plated on tryptic soy agar in duplicate. The percentage killing was calculated by determining the ratio of the number of cfu surviving at 60 minutes in wells with bacteria, antibodies, complement and HL-60 cells to the number of cfu surviving in tubes lacking antibodies but containing bacteria, complement and HL-60 cells. Controls containing bacteria, complement and mAb was included to adjust for any reduction in cfu due to clumping.

[0181] The following examples are provided by way of illustration, not by way of limitation.

EXAMPLES

Example 1: Preparation of *S. aureus* Serotype 8 Capsular Polysaccharide.

[0182] In this example, production of various size ranges of *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide is described. The structure *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide repeat unit is shown in Figure 1. The methods described herein are effective in producing serotype 8 capsular polysaccharide with molecular weights ranging from about 20 kDa to 700 kDa. By proper selection of conditions, high molecular weight serotype 8 capsular polysaccharides can be isolated and purified ranging from 50 kDa to 700 kDa in molecular weight. For use in immunogenic

compositions, serotype 8 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 70 kDa to 300 kDa in molecular weight and many desired ranges. Based on growth characteristics and the quantity of capsule produced, strains PFESA0005 or PFESA0286 were used for the production of serotype 8 capsular polysaccharide. Capsules isolated from strains PFESA0005 or PFESA0286 were shown to be identical.

[0183] For production of serotype 8 capsular polysaccharides, the strains were grown in a complex medium consisting primarily of a carbon source (either lactose or sucrose), hydrolyzed soyflour as the nitrogen source, and trace metals. The strains were grown in bioreactors for 2 to 5 days.

[0184] Prior to autoclaving, a sample was removed to test the level of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) in the culture. In the presence of 0.05% polysorbate 80, the concentration of SEB in the fermentation was 15-20 ng/ml. Previous experiments showed that autoclaving the culture for 1 hour reduced the level of SEB to less than 0.1 ng/ml, which is below the limit of detection for the TECRA kit.

[0185] Diafiltered, ethanol-fractionated polysaccharide was loaded onto a Q-Sepharose AEC column and eluted with a linear gradient of NaCl as described above. Fractions were analyzed by the *O*-acetyl assay and double immunodifusion test for presence of serotype 5 polysaccharide and phosphate assay for the presence of teichoic acid (TA). The presence of serotype 8 polysaccharide was detected in fractions 35 to 95 (Figures 2A-B).

[0186] To reduce contamination with teichoic acid, fractions 35 to 75 were pooled and any residual teichoic acid was oxidized with sodium-metaperiodate to allow its removal by 3K diafiltration against diH_2O.

[0187] Purification of serotype 8 capsular polysaccharide used for the preparation of conjugates was performed by two different methods that rely on elevated temperature and low pH to affect the release of capsule from the cell and reduce the molecular weight of the polysaccharide. The resulting molecular weight depended on the time, temperature and pH of the hydrolysis step.

[0188] Characterization of serotype 8 capsular polysaccharide was performed using the techniques specified in Table 1.

Table 1: Characterization Assays for Purified *S. aureus* Serotype 8 Capsular Polysaccharides.

Specificity	Assay
Residual Protein	Lowry colorimetric assay
Residual Nucleic acids	260nm scan
Residual Teichoic Acid	Phosphate colorimetric assay
Residual Peptidoglycan	HPAEC-PAD
Size	SEC-MALLS
Composition	HPAEC-PAD
Identity	1H-NMR or reaction with specific mAb
O-acetylation	1H-NMR
Concentration	MALLS-RI or HPAEC-PAD

[0189] Capsule polysaccharides produced by the methods described below result in pure well characterized polysaccharides with low levels of protein, nucleic acid, peptidoglycan and teichoic acid contaminants.

[0190] In the first method, following release of the capsule polysaccharide from the cell and reduction of molecular weight, the preparation was treated with a cocktail of enzymes (*e.g.*, ribonuclease, deoxyribonuclease, lysozyme and protease) to digest impurities. After incubation, residual impurities are precipitated by the addition of ethanol (final concentration about 25%). After removal of the residual ethanol, a solution containing capsule polysaccharide was loaded onto an anion exchange column (Q-Sepharose) and eluted with a linear salt gradient. Fractions containing capsule polysaccharide were pooled and treated with sodium meta-periodate. This treatment resulted in the oxidative hydrolysis of residual teichoic acid contaminant, but did not affect serotype 8 capsular polysaccharide. The reaction was quenched by the addition of ethylene glycol. The material was concentrated and diafiltered against dH_2O to remove any residual reagents and by-products.

[0191] The second method was used to produce capsule polysaccharide without the use of enzymes to digest the various cell-derived impurities. In this method, following release of the capsule polysaccharide from the cell and reduction of molecular weight, the hydrolyzed fermentation broth was clarified by microfiltration followed by ultrafiltration and diafiltration. The solution was treated with activated carbon to remove impurities. After carbon treatment, the

material was treated with sodium meta-periodate to oxidize residual teichoic acid followed by quenching with propylene glycol. The material was concentrated and diafiltered against dH_2O to remove any residual reagents and by-products.

[0192] Preparations produced using either method resulted in pure capsular polysaccharides with low levels of protein, nucleic acid and teichoic acid contaminants. The methods described can be used to produce specific ranges of the desired high molecular weight polysaccharides by varying the conditions of hydrolysis. Examples of capsular polysaccharide obtainable by the methods described herein are shown in Table 2 below. Batches of purified serotype 8 capsular polysaccharide had high purity as indicated by no teichoic acid (TA), peptidoglycan and low residual protein. *See*, Table 2. The range of lower molecular weights spanned 20.4 kDa to 65.1 kDa, and the purified polysaccharides were highly O-acetylated (~100%). The levels of nucleic acid contamination were low (0.12-2.45%).

Table 2: Characterization of Serotype 8 Capsular Polysaccharide Preparations.

Sample	Total CP8 Purified	MW	Protein	Nuc. Acid	O-Acetyl
	mg	(kDa) (g/mol)	(Lowry) % (w/w)	(260 nm scan) % (w/w)	NMR %
1	310	27.0	1.2	0.94	100
2	438	29.0	2.4	2	100
3	179	20.4	0.37	0.12	108

[0193] *Molecular Weight Selection of Capsular Polysaccharides:* A kinetic analysis demonstrated that a broad range of molecular weights of capsule polysaccharides can be generated by the methods described herein. Initially, larger polysaccharides were produced by the bacterial cells, and subsequently, a desired molecular weight range selected and then purified by manipulation of the pH and heat conditions of the heat and hydrolysis steps.

[0194] Heat treatment of *S. aureus* fermentation broth is a process step between fermentation and capsular polysaccharide recovery. This process step uses heat to treat pH-adjusted broth for a specified period. The goals of the heat treatment at

low pH were to kill cells, inactivate enterotoxins, release cell bound polysaccharide and reduce molecular weight to the desired size. Among these goals, the reduction of molecular weight was the slowest in terms of processing time required in this step. Therefore, the other goals were inevitably achieved within the treatment time considered.

[0195] *Heat Treatment:* pH and temperature conditions for selecting various molecular weight ranges of capsule polysaccharides were determined. A 15L Biolafitte Fermenter was used for these studies. The fermentation broth was transferred to the fermenter by a peristaltic pump. Using an agitation speed of about 200 rpm, the broth pH was adjusted with concentrated sulfuric acid. Then, the broth temperature was raised to the set value. The heat treatment time started as soon as the temperature reached the set point. When the desired treatment time was reached, the broth was cooled to room temperature. In-process samples were taken to determine polysaccharide concentration and molecular weight by HPLC and SEC-MALLS systems, respectively. The molecular weight (MW) data was used in the kinetic analysis. The MW profiles were determined over time at pH 3.5, 4.0 and 5.0. *See*, Figure 3A.

[0196] The kinetics of mild acid hydrolysis of polysaccharides was conducted using purified serotype 8 capsular polysaccharide obtained from the process. The purified polysaccharide solution was adjusted to the desired pH for the experiment with sulfuric acid. About 1.5 mL of the solution was transferred to each of the 15mL centrifuge tubes. The tubes were placed in an oil bath equipped with a precision temperature control system. The tube was taken out at a predetermined time interval and was quenched in an ice bucket. At the end of the experiment, an aliquot of 1M Tris buffer (pH 7.5) was added to the sample to adjust the pH back to about 7. The samples were analyzed by a SEC-MALLS system. The MW data was used in the kinetic analysis. The effect of temperature on the MW profile of CP8 at pH 3.5 was determined over time. *See*, Figure 3B.

Results

[0197] As shown in Figure 3A, a lower pH was more effective in reducing the molecular weight of the polysaccharide. Molecular weights between 300 kDa and 600 kDa can be generated using a pH of 5 at 95°C for between 15 minutes and 120

minutes. Likewise, molecular weights between 250 kDa and 450 kDa can be generated using a pH of 4 at 95°C for between 15 minutes and 120 minutes. Moreover, molecular weights between 120 kDa and 450 kDa can be generated using a pH of 3.5 at 95 °C for between 15 minutes and 120 minutes.

[0198] As shown in Figure 3B, the higher the temperature, the faster the rate of hydrolysis and broader the range of the molecular weights of polysaccharide produced with time. Use of a lower temperature, 55°C versus 95°C at the same pH, produces a narrower range of polysaccharide molecular weights.

[0199] Furthermore, Figure 4 demonstrates a correlation between the molecular weight of purified CP8 with the treatment time for mild acid (pH 3.5 at 95°C) hydrolysis. The purified polysaccharide is the final product obtained from the recovery process detailed previously. As also shown in Figure 4, an increase in time of heat treatment of the *S. aureus* PFESA0005 strain at pH 3.5 resulted in smaller molecular weight CP8, whereas shorter heat treatment times at pH 3.5 resulted in higher molecular weight CP8. The size of the serotype 8 capsular polysaccharides ranged from about 80 kDa to about 220 kDa depending on the length of time of heat treatment at pH 3.5. The correlation between the time of heat treatment at low pH and size of the purified CP8, as shown in Figure 4, allows for an estimation of the treatment time required to produce purified polysaccharide with a specified range of molecular weight.

[0200] It is important to note that as demonstrated above the full range of molecular weights of serotype 8 capsular polysaccharides from 20 kDa to more than 500 kDa can be produced, released and purified. The methods therefore may be used to produce specific ranges of desired high molecular weight capsule polysaccharides such as is shown in Table 3. The relatively narrow range of molecular weight polysaccharide produced where the peak molecular weights range from 87 kDa to 108 kDa represents a well characterized range of molecular weights that may be obtained by the methods described herein. A particularly advantageous range of high molecular weight polysaccharides, ranging from 70 kDa to 300 kDa or from 70 kDa to 150 kDa, is useful in making immunogenic compositions by conjugating the capsular polysaccharide to a carrier molecule or protein (*see*, Table 3). The conditions used to generate the CP8 capsule

polysaccharide having a molecular weight range of from about 80 to 120 kDa are as follows: 95°C, pH 3.5 for 300 minutes.

Table 3: Production of Specific Range of High Molecular Weight Serotype 8 Capsular Polysaccharide.

Run	Serotype 8 Capsular Polysaccharide MW (kDa)
1	98
2	89
3	108
4	108
5	89
6	100
1	99
2	113
3	105
4	100
5	87

Example 2: Conjugation of Serotype 8 Capsular Polysaccharides to CRM_{197}.

[0201] This example describes processes and characterization assays used in the production of *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide-CRM_{197} conjugates. Different conjugation chemistries were developed for conjugating *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide to this carrier protein. For example, conjugation using PDPH (3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide) results in a covalent thioether bond between the CP and the carrier protein. Alternatively, conjugation using CDI/CDT (1,1-carboyldiimidazole/1,1-carboyl-di-1,2,4-triazole) results in a one-carbon or zero-carbon linker between CP and carrier protein.

Conjugation of Serotype 8 Capsular Polysaccharide to CRM_{197} by PDPH Conjugation Chemistry.

[0202] The PDPH conjugation chemistry is a multi-step process that involves activation of the polysaccharide, removal of the thiol protecting group, purification of the activated polysaccharide intermediate, activation and purification of the CRM_{197} protein, and conjugation of the activated components followed by purification. After introduction of a thiol group containing linker to the polysaccharide and a haloacetyl group to the CRM_{197} protein carrier, *S. aureus*

serotype 8 capsular polysaccharide was linked to the protein carrier through a thioether bond. Bromoacetyl groups were introduced into the CRM_{197} protein by reaction of amine groups with the N-hydroxysuccimide ester of bromoacetic acid. To generate thiolated polysaccharide, the carbodiimide activated carboxylate groups of N-acetylmannosaminouronic acid in the polysaccharide were coupled to the hydrazide group of the sulfhydryl-reactive hydrazide heterobifunctional linker 3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide (PDPH). Thiols of PDPH-thiolated polysaccharide, generated by reduction with DTT and purified by SEC on a Sephadex G25 column, reacted with bromoacetyl groups of activated protein resulting in covalent thioether linkage formed by bromine displacement between polysaccharide and the carrier protein. Non-reacted bromoacetyl groups were "capped" with cysteamine hydrochloride (2-aminoethanethiol hydrochloride). The reaction mixture was then concentrated and diafiltered. The remaining unconjugated bromoacetyl groups were capped with cysteamine hydrochloride to ensure no reactive bromoacetyl groups were left after conjugation. This formed a covalent bond between the thiol end of cysteamine and the acetyl group on the lysine residue after displacement of bromine.

[0203] *1. Thiolation of S. aureus Serotype 8 Capsular Polysaccharide with PDPH*: The polysaccharide was first activated by thiolation with PDPH. The polysaccharide was mixed with a freshly prepared PDPH stock solution (250 mg/mL in DMSO), an EDAC stock solution (90 mg/mL in diH_2O), and MES buffer stock solution (0.5M, pH 4.85) to make the final solution 0.1 M MES, and 2 and 4 mg polysaccharide/mL while maintaining a polysaccharide:PDPH:EDAC ratio by weight of 1:0.6:1.25 for serotype 8 capsular polysaccharide. This mixture was incubated for 1 hour at room temperature and then dialyzed against a 1000X volume of distilled H_2O four times using a 3500 MWCO dialysis device at between 4°C and 8°C to remove unreacted PDPH. The PDPH-linked polysaccharide was made 0.2 M DTT and incubated at room temperature for 3 hours or overnight at between 4°C and 8°C. Excess DTT as well as the by-products of the reaction were separated from the activated saccharide by SEC using Sephadex G25 resin and distilled water as the mobile phase. Fractions were assayed by the DTDP assay for thiol groups and thiol-positive fractions that eluted

near the void volume of the column were pooled. The pool of fractions was assayed by the PAHBAH and the O-acetyl assays to determine the degree of activation which is expressed as a molar percent of the repeat units containing a thiol group (molar concentration of thiols/molar concentration of repeat units). The activated polysaccharide was lyophilized and stored at -25°C until needed for conjugation.

[0204] The results from the reproducibility of serotype 8 polysaccharide thiolation with PDPH are shown in Table 4. Degree of activation of serotype 8 polysaccharide was in the range 12% to 16%, which corresponds to approximately one linker molecule attached per ten capsular polysaccharide repeat units to one linker molecule per five repeat units.

Table 4: Activation of Serotype 8 Capsular Polysaccharide with PDPH – Reproducibility Study.

Serotype 8 polysaccharide-PDPH	Activation (% M_{SH}/M_{RU})	Scale mg	Yield mg (%, w/w)
1	14	36	30 (83)
2	16	30	27 (91)
4	16	38	42 (110)
5	12	40	44 (110)

[0205] *2. Carrier protein activation:* Separately, the carrier protein was activated by bromoacetylation. CRM_{197} was diluted to 5 mg/mL with 10 mM phosphate buffered 0.9% NaCl pH 7 (PBS) and then made 0.1 M $NaHCO_3$ pH 7.0 using 1 M stock solution. The N-hydroxysuccinimide ester of bromoacetic acid (BAANS) was added at a CRM_{197}:BAANS ratio 1:0.25 (w:w) using a BAANS stock solution of 20 mg/mL DMSO. This reaction mixture was incubated at between 4 and 8°C for 1 hour then purified using SEC on Sephadex G-25. The purified activated CRM_{197} was assayed by the Lowry assay to determine the protein concentration and then diluted with PBS to 5 mg/mL. Sucrose was added to 5% wt/vol as a cryoprotectant and the activated protein was frozen and stored at -25°C until needed for conjugation.

[0206] Bromoacetylation of lysine residues of CRM_{197} was very consistent, resulting in the activation of 19 to 25 lysines from 39 lysines available (*see*, Table 5). The reaction produced high yields of activated protein.

Table 5: Yields and Degree of Bromoacetylation of CRM_{197}.

Preparation	Lysines Activated (n=)	Scale (mg)	Yield (% w/w)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

[0207] *3. Coupling Reaction:* Once the activated capsule polysaccharide and activated carrier protein were prepared, the two were combined in a conjugation reaction. The lyophilized and thiolated polysaccharide was dissolved in 0.16 M borate pH 8.95, mixed with thawed bromoacetylated CRM_{197} and distilled water to make the final solution 0.1 M borate, 1:1 wt/wt ratio of CRM_{197}:polysaccharide, and 1 mg/mL polysaccharide. This mixture was incubated at room temperature for between 16 and 24 hours. Unreacted bromoacetyl groups on the protein were capped by adding cysteamine hydrochloride at a ratio of CRM_{197}:cysteamine of 1:2 (wt/wt) using a 135 mg/mL stock solution of cysteamine dissolved in 0.1 M borate pH 8.95 and incubated for 4 hours at room temperature. The capsule polysaccharide-CRM_{197} conjugate (conjugate) was purified by diafiltering 50-fold against 0.9% NaCl using a 100K polyethersulfone ultrafilter.

[0208] The results from the reproducibility of serotype 8 capsular polysaccharide thiolation studies with PDPH demonstrated that the degree of activation of the polysaccharide was in the range 12 to 16 % which corresponds to approximately one linker molecule attached per ten polysaccharide repeat units to one linker molecule per five repeat units.

Conjugation of Serotype 8 Capsular Polysaccharide to CRM_{197} by CDI/CDT Conjugation Chemistry.

[0209] CDI and CDT afford a one-step conjugation process where the polysaccharide is activated in an anhydrous environment (DMSO) to form imidazole or triazole carbamate moieties with available hydroxyls and acylimidazole or acyltriazole moieties with carboxylic acids. Addition of a protein carrier (in DMSO) leads to the nucleophilic displacement of the imidazole or triazole by lysine and formation of a carbamate linkage (for activated hydroxyls) and the amide linkage (for activated carboxylic acids).

[0210] Both CDI and CDT conjugation chemistries produced serotype 8 capsular polysaccharide covalently linked to the carrier protein, which was indicated by the presence of the saccharide and protein in the fractions from size exclusion chromatography, and by amino acid analysis of glycolaldehyde capped or cysteamine hydrochloride capped conjugate.

[0211] Summary of the results from the preparation of several lots of conjugates prepared by both PDPH and CDI/CDT chemistries for capsular serotype 8 with polysaccharide size in the range of 20 kDa to 40 kDa are shown in Table 6 below. There were no significant differences in the free capsule polysaccharide, ratio of polysaccharide-protein and yields of conjugates generated by these two conjugation methods. The antigenicity of conjugated serotype 8 capsular polysaccharide was not altered by conjugation as portrayed by identity precipitin line between conjugates and native polysaccharide.

Table 6: Characterization of Serotype 8 Capsular Polysaccharide-CRM197 Prepared by Two Conjugation Chemistries.

Chemistry	CP Yield (%)	Protein Yield (%)	Output Ratio	Free sugar (%)	Free Protein (%)	Lysines Modified	Size (MW or Kd (% < 0.3), sacc/prot))
CDI/CDT	46-62	54-55	0.8-0.9	22-25	< 1	7-8	34/57 to 60/57
PDPH	34-70	61-83	0.6-0.9	15-41	ND	11-16	74-92%

[0212] As shown above, the methods described herein may be used to produce specific ranges of desired high molecular weight capsule polysaccharides. We sought to prepare conjugates from a pre-selected range of high molecular weight

that could be filtered and purified serotype 8 capsular polysaccharide for use in immunogenic compositions. Table 7 summarizes the analysis of serotype 8 capsular polysaccharide conjugates where the serotype 8 capsule polysaccharide ranged in molecular weight from about 80 kDa to 120 kDa and the imidazole conjugation chemistry was utilized. The molecular weights of the resulting conjugates ranged from 595 kDa to 1708 kDa. The number of conjugated lysines per CRM_{197} ranged from a high of 9 to a low of 3. The free capsule polysaccharide ranged from a high of 6% to a low of 2%.

Table 7: Conjugates With Preselected Molecular Weight Range of Serotype 8 Capsular Polysaccharide.

Run	Poly MW (kDa)	Yield (%)	Free Sacc. (%)	MW by SEC-MALLS (kDa)	Lysines Modified
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

[0213] Both conjugation chemistries produce serotype 8 capsular polysaccharide covalently linked to carrier protein. There were no significant differences in free capsule polysaccharide, ratio of serotype 8 capsular polysaccharide:protein and yields of conjugates generated by these two methods.

Example 3: One Pot Versus Complex CDI/CDT Process.

[0214] As described above, methods for making the immunogenic conjugates of the invention involve covalent conjugation of the capsular polysaccharides with the carrier proteins using conjugation chemistry involving CDI (1,1-carbonyldiimidazole), CDT (1,1-carboyl-di-1,2,4-triazole) or PDPH (3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide). Use of CDI/CDT results in a one-carbon or zero-carbon linker between capsular polysaccharide and carrier protein, while use of PDPH results in a covalent thioether bond between capsular polysaccharide and carrier protein.

US

[0215] The PDPH-based method was a multi-step process that involved activation of the polysaccharide, removal of a thiol protecting group on the polysaccharide, purification of the activated polysaccharide intermediate, activation and purification of the protein carrier, and conjugation of the activated components followed by purification. In this method, *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharides were reacted with PDPH and a carbodiimide in an aqueous solution such as 0.1M MES to produce PDPH-linked polysaccharides. The PDPH-linked polysaccharides were reacted with a reducing agent to produce activated polysaccharides that were then purified. Carrier proteins were reacted with bromoacetic acid N-hydroxysuccinimide ester in an aqueous solution to produce activated carrier proteins that were then purified. The purified activated serotype 8 polysaccharides were then reacted with the purified activated carrier proteins to produce serotype 8 polysaccharide:carrier protein conjugates.

[0216] In contrast, the CDI- and CDT-based methods were one or two step conjugation processes, in which the capsular polysaccharide was activated in an anhydrous environment (*i.e.*, DMSO) to form imidazole or triazole carbamate moieties with available hydroxyls and acylimidazole or acyltriazole moieties with carboxylic acids. Addition of the protein carrier (in DMSO) lead to a nucleophilic displacement of the imidazole or triazole by lysine and formation of a carbamate linkage (for activated hydroxyls) and the amide linkage (for activated carboxylic acids). Accordingly, two CDI- or CDT-based methods were developed: a more complex process and a simpler one-pot process. In the more complex process, *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharides were compounded with imidazole or triazole, lyophilized, and then reacted with CDI or CDT in an organic solvent (such as DMSO) to produce activated serotype 8 polysaccharides. The activated serotype 8 polysaccharides were purified and then reacted with carrier proteins in the organic solvent to produce serotype 8 polysaccharide-carrier protein conjugates. The one-pot process was similar to the complex process except that the activated serotype 8 polysaccharides were not purified prior to the reaction with carrier proteins.

CDI/CDT Complex Process.

[0217] *Activation of Polysaccharide:* Serotype 8 polysaccharide was mixed with 10 g triazole/g serotype 8 and lyophilized. The resulting cake was dissolved in DMSO at 2.0 mg serotype 8 polysaccharide/mL. The water content was determined. A freshly prepared stock solution of CDT at 100 mg/mL in DMSO was added to achieve a molar amount of CDT equivalent to the water. Alternatively, the amount of CDT added may be adjusted to achieve a higher or lower degree of activation. This was held 30 minutes at 23°C.

[0218] *Purification of Activated Serotype 8 Polysaccharide:* The solution of activated serotype 8 (ACP8) was poured into 25 volumes of water to destroy excess CDT. This was concentrated to its original volume on a 10 kDa PES membrane at approximately 1 mg/cm^2 and diafiltered against water for at least 10 volumes. This step was completed in less than 4 hours. The diafiltered material was mixed with 10 g triazole/g of original serotype 8 polysaccharide and lyophilized.

[0219] *Preparation of Lyophilized CRM:* CRM was diafiltered against 0.4% NaCl/5% sucrose at constant volume on a 10 kDa PES membrane for at least 10 volumes. The protein concentration was determined and sufficient diafiltration buffer was added to bring the protein concentration to 5.0 g/L, thus affording a w/w ratio of NaCl/CRM = 0.8. The CRM was lyophilized.

[0220] *Conjugation:* Activated, diafiltered serotype 8 polysaccharide was dissolved in DMSO at 1 mg/mL. Borate solution at 100 mM was added to achieve 2% v/v.

[0221] CRM was resuspended at 2 mg/mL and, when dissolution was complete, combined with the ACP8 solution. This was allowed to react at 23°C for 20 hours.

[0222] The conjugate reaction was poured into 24 volumes of 5 mM borate pH 9.0 and allowed to stir at room temperature for 1 hour. It was then adjusted to pH 7.5 with 0.5 M phosphate buffer, pH 6.5. This was filtered through a 5 micron filter and concentrated to the original volume on a 300 kDa PES membrane at a load of ~ 1 mg/cm^2 and diafiltered against at least 10 volumes of water. The resulting concentrate was filtered through a 0.22 micron filter and stored at 2°C-8°C.

CDI/CDT One Pot Process.

[0223] *CRM_{197} Matrix Exchange:* CRM_{197} was diafiltered to exchange from the bulk matrix of approximately 10 mM phosphate/80 mM NaCl/15% sucrose, pH 7 to 5 mM imidazole/0.72 % NaCl/15 mM octyl-β-D-glucoside, pH 7. The exchange allowed the removal of phosphate and sucrose which are detrimental to the conjugation and defines the sodium chloride content carried into the conjugation. Octyl-β-D-glucopyranoside is added prevent particle formation after sterile filtration.

[0224] The matrix of the CRM_{197} was exchanged by tangential flow filtration against 5 mM imidazole/0.72%/15 mM octyl-B-D-glucopyranoside pH 7 through 10 diavolumes using 10K MWCO PES membranes at a retentate concentration of approximately 4 mg/mL. Typical membrane challenge was 2 grams/ft^2 and the target final CRM_{197} concentration in the matrix was 6 mg/mL. The CRM_{197} was stored at 2°C-8°C.

[0225] *Activation/Conjugation:* The activation/conjugation process for *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide consisted of the following steps: 1) Matrix exchange of the CRM197; 2) Compounding of polysaccharide; 3) Shell freezing and lyophilization of CRM_{197} and compounded polysaccharide; 4) Dissolution of the lyophilized polysaccharide and CRM_{197}; 5) Activation of the polysaccharide; 6) Conjugation of the activated polysaccharide to CRM_{197}; and 7) Purification of the conjugate (dilution, diafiltration, sterile filtration).

[0226] The polysaccharide was compounded with 10 grams of 1,2,4- triazole excipient per gram of polysaccharide. The excipient was added as a powder to the polysaccharide, with a solution obtained after less than 15 minutes of mixing at ambient temperature.

[0227] The compounded polysaccharide and CRM_{197} were shell frozen separately using a -75°C ethanol bath. The volume per 1L bottle was approximately 500 mL.

[0228] For the polysaccharide dissolution, DMSO was added to the individual lyophilization bottles of the polysaccharide to obtain a suspension and then transferred to the activation/conjugation reaction vessel for heating. DMSO was added to obtain 2 g/L concentration. A clear solution was obtained as the

suspension reached approximately 45°C with mixing. The solution was then cooled to 23°C ± 2°C.

[0229] For the CRM_{197} dissolution, DMSO was added to the individual lyophilization bottles containing the CRM_{197} to obtain a suspension and then transferred to a second vessel for mixing. DMSO was added to obtain 2 g/L concentration. A clear solution was typically obtained in les than 15 minutes.

[0230] The polysaccharide/DMSO solution was sampled for Karl Fischer analysis to determine moisture content. CDT was prepared as a 100 mg/mL solution in DMSO and was added based on determined moisture content. Continuous addition of the CDT solution was performed over about 5 minutes at 23°C ± 2°C with mixing. The reaction was allowed to proceed for a minimum of 30 minutes at 23°C ± 2°C. The reaction was sampled to determine activation level (UV 220/205 nm) and then 100 mM sodium borate, pH 9 was added to obtain a 1.5% aqueous solution. The reaction solution was then stirred for a minimum of 30 minutes at 23°C ± 2°C.

[0231] For conjugation of the activated polysaccharide to CRM_{197}, DMSO was added to target a 0.8 mg/mL reaction concentration. The dissolved CRM_{197} in DMSO was then added to the activated polysaccharide solution with mixing. The reaction was stirred for a minimum of 4 hours at 23°C ± 2°C.

[0232] The reaction solution was 10X diluted by its addition into 5mM sodium tetraborate, pH 9 with mixing to hydrolyze residual activation groups. The diluted solution was passed through a 5 µm filter and concentrated to a target retentate concentration of 2 g/L. Tangential flow filtration was performed using 300K regenerated cellulose membranes through 20 diavolumes with 5 mM succinate, pH 7. Typical membrane challenge was 1 gram/ft^2. The purified conjugate was passed through a 0.22 micron filter and stored at 2°C-8°C.

Example 4: Conjugation of Serotype 8 Capsular Polysaccharide Using One-Pot and Complex Conjugation Process.

[0233] This example demonstrates that pre-selected range of molecular weights of capsule polysaccharides can be used for conjugation in either the one-pot or complex process. The larger polysaccharides are initially produced by the

bacterial cells, and the resulting molecular weight range purified can be controlled by pH and heat of the hydrolysis process in Example 1 (as shown in Table 3).

[0234] In this example, eight batches where the serotype 8 capsule polysaccharide ranged in molecular weight from about 80 kDa to about 120 kDa were selected and conjugation was performed using activation with 1,1-carbonyl-di-(1,2,4-triazole) for serotype 8 capsular polysaccharide. *See*, Table 8. The molecular weights of the resulting conjugates ranged from 595 kDa to 1708 kDa. The number of conjugated lysines per CRM ranged from a high of 13 to a low of 3. The free sugar ranged from a high of 11% to a low of 1%.

Table 8: Serotype 8 Capsular Polysaccharide Conjugates Prepared with 80 kDa to 120 kDa Capsular Polysaccharides.

Process	Run	Poly MW (kDa)	Sacc Yield (%)	Free Sugar (%)	MW by SEC-MALLS (kDa)	Lysine
One Pot	1	98	86	1	751	11
	2	89	80	1	675	13
	3	108	76	4	1073	5.0
	4	108	69	4	819	5.2
	5	89	85.1	8	1708	10
	6	100	94.0	11	1577	5
Complex	1	99	88	6	943	4
	2	113	73	5	841	3
	3	105	79	3	719	7
	4	100	86	2	630	9
	5	87	90	3	595	6

Example 5: Evaluation of the Conjugated Native- And Base-Treated Serotype 8 Capsular Polysaccharide In A Murine Bacteremia Model.

[0235] The importance of O-acetyl groups present on native serotype 8 capsular polysaccharide before conjugation for induction of functional antibody responses was evaluated for capsular polysaccharide conjugates. Serotype 8 capsular polysaccharide was de-O-Acetylated under mild basic conditions, and both NMR and Ion Chromatography (IC) confirmed absence of O-acetylation in serotype 8 capsular polysaccharide de-O-Ac-CRM. The CP8 de-O-Ac-CRM conjugate was prepared by conjugation of de-O-Ac CP8 polysaccharide to CRM by PDPH chemistry as described in Example 2.

[0236] The serotype 8 capsular polysaccharide conjugate unexpectedly showed no measurable acetyl groups by IC method. This could be attributed to differences in the structure, sites of O-acetylation compared to other *S. aureus* capsular polysaccharides, which in turn could cause the removal or modification of acetyl groups in serotype 8 capsular polysaccharides during conjugation.

[0237] The murine bacteremia model was used to evaluate efficacy of the native versus base-treated serotype 8 capsular polysaccharide conjugated to CRM_{197}. Groups of female BALB/c mice (15/group) were vaccinated at weeks 0, 3 and 6 with 1 mcg serotype 8 capsular polysaccharide de-O-Ac-CRM or 1 µg serotype 8 capsular polysaccharide O-Ac-CRM. Vaccines were formulated with 22 mcg $AlPO_4$. Animals were challenged with *S. aureus* PFESA0003, and bacteria were enumerated from the blood three hours later. The data showed that there was a statistically significant ($p=0.0362$) reduction in bacterial cfu recovered from the blood of animals immunized with untreated native serotype 8 capsular polysaccharide conjugate as determined by the Student t-Test (Table 9). In animals that were immunized with base-treated serotype 8 capsular polysaccharide conjugate, the bacterial cfu recovered from blood were similar to the saline control group.

Table 9: Serotype 8 Capsular Polysaccharide-CRM_{197} Conjugate Reduces Bacteremia Caused By *S. aureus* PFESA0003 In Mice.

Antigen	Strain/Dose	LogCFU/Blood	Significance (p value)
Saline	PFESA0003 1.14×10^8	4.35	
CP8 de-O-Ac-CRM		4.45	
CP8 O-Ac-CRM		3.93	0.03

Example 6: Evaluation of the Conjugated Native And Base Treated Serotype 8 Capsular Polysaccharide In A Murine Bacteremia Model.

[0238] Serotype 8 capsular polysaccharide conjugates were evaluated for their ability to protect mice in a pyelonephritis model. Bacterial counts in the blood of mice receiving i.p. *S. aureus* challenge were significantly reduced as compared to controls immunized with PBS.

[0239] Two studies were conducted to evaluate efficacy of CP8-CRM_{197} conjugate in the murine bacteremia model, described previously, after challenge with *S. aureus* PFESA0268 (Type 8). The first study (Figure 5) showed a significant reduction of bacteremia (p=0.0308). For the study, groups of 6-8 week old Swiss Webster mice (n=30) were actively immunized by subcutaneous injection with 1 μg serotype 8 capsular polysaccharide-CRM_{197} and saline both formulated with 100 μg $AlPO_4$ at 0, 2 and 4 weeks and challenged at week 6 by the intravenous route with *S. aureus* PFESA0268 (Type 8). Prior challenge experiments were conducted to optimize the dose of challenge strain at the age mice reach after three vaccinations. Statistical evaluation of survival studies was carried out by Kaplan-Meier analysis.

Example 7: Opsonic Activity Of Sera From Mice Immunized With Native And Chemically Modified Serotype 8 Capsular Polysaccharide Conjugates.

[0240] Select mouse sera (n=5) with high serotype 8 capsular polysaccharide titers from a vaccination study were compared for opsonic activity using PFESA0005 strain. The OPA results (Table 10) show that only conjugates prepared by the conjugation of native serotype 8 capsular polysaccharide elicited opsonic antibodies in mice. It is noteworthy that the de-OAc serotype 8 capsular polysaccharide conjugate was immunogenic in mice but the antibodies elicited were not opsonic in this assay. OPA titers are reported as reciprocal of dilution at which 40% killing was observed.

Table 10: Opsonic Activity of Native Serotype 8 Capsular Polysaccharide vs. de-O-Ac Serotype 8 Capsular Polysaccharide-CRM Immunized Mouse Sera.

De-O-Ac Serotype 8 Capsular Polysaccharide-CRM		Serotype 8 Capsular Polysaccharide-CRM	
OP titer Wk0 sera	OP titer Wk8 sera	OP titer Wk0 sera	OP titer Wk8 sera
<50	<50	50	150
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	450
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	4050

Example 8: Killing of *S. aureus* Strains by Serotype 8 Conjugate Antisera can be Inhibited by Addition of Native Serotype 8 Capsular Polysaccharide.

[0241] To confirm the specificity of the killing, the opsonophagocytic assay was performed in the presence of native serotype 8 capsular polysaccharide or unrelated pneumococcal polysaccharide (Pn 14 poly), essentially as described above.

[0242] The results (Table 11) showed that the presence of native serotype 8 capsular polysaccharide in reaction mixture inhibited opsonophagocytic killing of *S. aureus* PFESA0286 (Type 8). These results confirm that opsonophagocytic killing by immune sera is mediated by capsule specific antibodies.

Table 11: Addition Serotype 8 Capsular Polysaccharide Inhibits Opsonophagocytic Killing of *S. aureus* by Immune Sera.

Monkey	Sera Sample	OPA titer
	Wk0	<50
	Wk8	4050
02D133	Wk0 + 20 μg CP8 poly	<50
	Wk8 + 20 μg CP8 poly	<50
	Wk0 + 20 μg Pn14 poly	<50
	Wk8 + 20 μg Pn 14 poly	4050
	Wk0	<50
	Wk8	4050
A4N122	Wk0 + 20 μg CP8 poly	<50
	Wk8 + 20 μg CP8 poly	<50
	Wk0 + 20 μg Pn14 poly	<50
	Wk8 + 20 μg Pn 14 poly	1350

SUMMARY

[0243] All conjugation chemistries produced serotype 8 capsular polysaccharide covalently linked to the carrier protein CRM_{197}. There were no significant differences in free saccharide, ratio of serotype 8 capsular polysaccharide:protein and yields of conjugates generated by these methods.

Example 9: Preparation of *S. aureus* Serotype 5 Capsular Polysaccharide.

[0244] In this example, production of various size ranges of *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is described. The structure of *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide repeat unit is shown in Figure 6. The methods described

herein are effective in producing serotype 5 capsular polysaccharide with molecular weights ranging from about 20 kDa to 800 kDa. By proper selection of conditions, high molecular weight serotype 5 capsular polysaccharides can be isolated and purified ranging from 50 kDa to 800 kDa in molecular weight. For use in immunogenic compositions, serotype 5 capsular polysaccharide can be isolated and purified ranging from 70 kDa to 300 kDa in molecular weight, from 70 kDa to 150 kDa and many other desired ranges. Strain PFESA0266 was chosen for serotype 5 capsular polysaccharide production based on growth characteristics and the quantity of capsule produced.

[0245] For production of serotype 5 capsular polysaccharide, strain PFESA0266 was grown in a complex medium consisting primarily of a carbon source (either lactose or sucrose), hydrolyzed soyflour as the nitrogen source, and trace metals. The strain was grown in bioreactors for 2 to 5 days.

[0246] Fermentation of the PFESA0266 strain was carried out as detailed above. At the time of harvest, OD_{600} of the culture was 7.38. The culture was autoclaved for 1 hour and after cooling, the culture was processed as described above to separate cells from supernatant material. Approximately 1 L each of filtered and concentrated supernatant and cells were recovered.

[0247] Prior to autoclaving, a sample was removed to test the level of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) in the culture. In the presence of 0.05% polysorbate 80, the concentration of SEB in the fermentation was 15-20 ng/ml. Previous experiments showed that autoclaving the culture for 1 hour reduced the level of SEB to less than 0.1 ng/ml, which is below the limit of detection for the TECRA kit.

[0248] Diafiltered, ethanol-fractionated polysaccharide was loaded onto a Q-Sepharose AEC column and eluted with a linear gradient of NaCl as described above. Fractions were analyzed by the *O*-acetyl assay and double immunodifusion test for presence of serotype 5 polysaccharide and phosphate assay for the presence of teichoic acid. The presence of serotype 5 polysaccharide was detected in fractions 60 to 105 (Figures 7A-B). To reduce contamination with teichoic acid, fractions 60 to 85 were pooled and any residual teichoic acid was oxidized with sodium-metaperiodate to allow its removal by 3K diafiltration against diH_2O.

[0249] Purification of serotype 5 capsular polysaccharide used for the preparation of conjugates was performed by two different methods that rely on elevated temperature and low pH to affect the release of capsule from the cell and reduce the molecular weight of the polysaccharide. The resulting molecular weight depended on the time, temperature and pH of the hydrolysis step.

[0250] Characterization of serotype 5 capsular polysaccharide was performed using the techniques specified in Table 1, *supra*.

[0251] Capsule polysaccharides produced by the methods described below result in pure polysaccharides with low levels of protein, nucleic acid, peptidoglycan and teichoic acid contaminants.

[0252] In the first method, following release of the capsule polysaccharide from the cell and reduction of molecular weight, the preparation was treated with a cocktail of enzymes (*e.g.*, ribonuclease, deoxyribonuclease, lysozyme and protease) to digest impurities. After incubation, residual impurities were precipitated by the addition of ethanol (final concentration about 25%). After removal of the residual ethanol, a solution containing capsule polysaccharide was loaded onto an anion exchange column (Q-Sepharose) and eluted with a linear salt gradient. Fractions containing capsule polysaccharide were pooled and treated with sodium meta-periodate. This treatment resulted in the oxidative hydrolysis of residual teichoic acid contaminant, but did not affect serotype 5 capsular polysaccharide. The reaction was quenched by the addition of ethylene glycol. The material was concentrated and diafiltered against distilled water (dH_20) to remove any residual reagents and by-products.

[0253] The second method was used to produce capsule polysaccharide without the use of enzymes to digest the various cell-derived impurities. In this method, following release of the capsule polysaccharide from the cell and reduction of molecular weight, the hydrolyzed fermentation broth was clarified by microfiltration followed by ultrafiltration and diafiltration. The solution was treated with activated carbon to remove impurities. After carbon treatment, the material was treated with sodium meta-periodate to oxidize residual teichoic acid followed by quenching with propylene glycol. The material was concentrated and diafiltered against dH_2O to remove any residual reagents and by-products.

50

[0254] Preparations produced using either method resulted in pure capsular polysaccharides with low levels of protein, nucleic acid and teichoic acid contaminants. The methods described can be used to produce specific ranges of the desired high molecular weight polysaccharides by manipulating the conditions of hydrolysis.

[0255] Examples of capsular polysaccharide obtainable by the methods described herein are shown in Table 12 below. Batches of purified serotype 5 capsular polysaccharide had high purity as indicated by no teichoic acid (TA), peptidoglycan and low residual protein. *See*, Tables 12 and 13. The range of molecular weights spanned 132.7 kDa to 800 kDa and the purified polysaccharides were highly O-acetylated, ranging from 90%-100%, and were 100% N-acetylated. The yields of serotype 5 capsular polysaccharide purification were 39% to 63%, and the size of purified serotype 5 polysaccharide varied from 35 kDa to 65 kDa (*see*, Table 12). The level of teichoic acid (TA) contamination was acceptable and levels of residual proteins and nucleic acid were also in acceptable ranges. NMR spectra of serotype 5 polysaccharide were identical to ones reported in the literature.

Table 12: Serotype 5 Capsular Polysaccharide Characterization.

Sample	Total CP5 Purified	Yield	MW	Protein	Nuc. Acid	O-acetyl
	mg	%	(kDa) (g/mol)	% (w/w)	(260 nm scan) % (w/w)	NMR (%)
1	101	39	47	0	0.5	94
2	91	48	65	1.2	2.5	96
3	578	63	35	2.5	0.7	75

Table 13: Additional Serotype 5 Capsular Polysaccharide Characterization.

Sample	MW (kDa)	CP5 (mg/ml)	O-acetyl NMR (%)	Identity NMR	N-acetyl NMR (%)
1	800.1	3.164	100	Pass	100
2	132.7	1.172	90	Pass	100
3	335.4	0.975	90	Pass	100
4	366.8	0.865	90	Pass	ND

ND = not detected

[0256] *Molecular Weight Selection of Capsular Polysaccharides*: A kinetic analysis demonstrated that a broad range of molecular weights of capsule polysaccharides can be generated by the methods described herein. Initially, larger polysaccharides were produced by the bacterial cells, and subsequently, a desired molecular weight range selected and then purified by manipulation of the pH and heat conditions of the heat and hydrolysis steps.

[0257] Heat treatment of *S. aureus* fermentation broth is a process step between fermentation and capsular polysaccharide recovery. This process step uses heat to treat pH-adjusted broth for a specified period. The goals of the heat treatment at low pH were to kill cells, inactivate enterotoxins, release cell bound polysaccharide and reduce molecular weight to the desired size. Among these goals, the reduction of molecular weight was the slowest in terms of processing time required in this step. Therefore, the other goals were inevitably achieved within the treatment time considered.

[0258] *Heat Treatment*: pH and temperature conditions for selecting various molecular weight ranges of capsule polysaccharides were determined. A 15L Biolafitte Fermenter was used for these studies. The fermentation broth was transferred to the fermenter by a peristaltic pump. Using an agitation speed of about 200 rpm, the broth pH was adjusted with concentrated sulfuric acid. Then, the broth temperature was raised to the set value. The heat treatment time started as soon as the temperature reached the set point. When the desired treatment time was reached, the broth was cooled to room temperature. In-process samples were taken to determine polysaccharide concentration and molecular weight by HPLC and SEC-MALLS systems, respectively. The molecular weight (MW) data was

used in the kinetic analysis. The MW profiles were determined over time at pH 3.5, 4.0 and 5.0. *See*, Figure 8A.

[0259] The kinetics of mild acid hydrolysis of polysaccharides was conducted using purified serotype 8 capsular polysaccharide obtained from the process. The purified polysaccharide solution was adjusted to the desired pH for the experiment with sulfuric acid. About 1.5 mL of the solution was transferred to each of the 15mL centrifuge tubes. The tubes were placed in an oil bath equipped with a precision temperature control system. The tubes were taken out at a predetermined time intervals and quenched in an ice bucket. At the end of the experiment, an aliquot of 1M Tris buffer (pH 7.5) was added to the sample to adjust the pH back to about 7. The samples were analyzed by a SEC-MALLS system. The MW data was used in the kinetic analysis. The effect of temperature on MW profile of CP5 at pH 4.5 was determined over time. See, Figure 8B.

Results

[0260] As shown in Figure 8A, a lower pH was more effective in reducing the molecular weight of the polysaccharide. In this example, ranges of molecular weights between about 300 kDa and about 600 kDa can be generated using a pH of 5 at 95 °C for between 15 minutes and 120 minutes. *See* Figure 8A. Likewise, choosing a pH of 4.5 at 95 °C for between 15 minutes and 120 minutes can yield polysaccharide molecular weight ranges between 200 kDa and 400 kDa. In addition, choosing a pH of 4.0 at 95 °C for between 15 minutes and 120 minutes can yield polysaccharide molecular weight ranges between 120 kDa and 300 kDa.

[0261] As shown in Figure 8B, the higher the temperature, the faster the rate of hydrolysis and broader the molecular weights of polysaccharide produced with time. Expressed another way, use of a lower temperature, 55 °C versus 95 °C at the same pH, produces a narrower range of polysaccharide molecular weights.

[0262] Furthermore, Figure 4 demonstrates a correlation between the molecular weight of purified serotype 5 capsular polysaccharide with the treatment time for mild acid (pH 4.5 at 95°C) hydrolysis. The purified polysaccharide is the final product obtained from the recovery process detailed previously. As also shown in Figure 4, an increase in time of heat treatment of the *S. aureus* PFESA0266 strain at pH 4.5 resulted in smaller molecular weight serotype 8 capsular polysaccharide,

whereas shorter heat treatment times at pH 4.5 resulted in higher molecular weight serotype 5 capsular polysaccharide. The size of serotype 5 capsular polysaccharides ranged from about 90 kDa to about 220 kDa depending on the length of time of heat treatment at pH 4.5. A correlation between the time of heat treatment at low pH and size of the purified serotype 5 capsular polysaccharides, as shown in Figure 4, allows for an estimation of the treatment time required to produce purified polysaccharide with a specified range of molecular weight.

[0263] As demonstrated above, the full range of molecular weights of serotype 5 capsular polysaccharides from 20 kDa to more than 500 kDa can be produced, released and purified. The methods described may be used to produce specific ranges of desired high molecular weight capsule polysaccharides such as is shown in Table 14. The relatively narrow range of molecular weight polysaccharide produced where the peak molecular weights range from 63 kDa to 142 kDa represents a well characterized range of molecular weights that may be obtained by the methods described herein. A particularly advantageous range of high molecular weight polysaccharides, ranging from 70 kDa to 300 kDa or from 70 kDa to 150 kDa, is useful in making immunogenic compositions by conjugating the capsular polysaccharide to a carrier molecule or protein. The conditions used to generate the CP5 capsule polysaccharide having a molecular weight range of from about 100 to 140 kDa are as follows: 95°C, pH 4.5 for 135 minutes. Different combinations of pH, temperature, and time, however, will also generate CP5 molecules with a molecular weight range of about 100 to 140 kDa.

Table 14: Production of Specific Range of High Molecular Weight Serotype 5 Capsular Polysaccharide.

Run	Serotype 5 Capsular Polysaccharide MW (kDa)
1	142
2	108
3	142
4	108
5	ND
6	ND
7	63
8	72
9	74

Run	Serotype 5 Capsular Polysaccharide MW (kDa)
10	63
11	ND

ND = not done

Example 10: Conjugation of Serotype 5 Capsular Polysaccharides to CRM_{197}.

[0264] This example describes processes and characterization assays used in the production of *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide-CRM_{197} conjugates. Different conjugation chemistries were developed for conjugating *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide to this carrier protein. For example, conjugation using PDPH (3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide) results in covalent thioether bond between the CP and the carrier protein; whereas conjugation using CDT (1,1-carboyl-di-1,2,4-triazole) results in a one-carbon or zero-carbon linker between the capsular polysaccharide and carrier protein.

Conjugation of Serotype 5 Capsular Polysaccharide to CRM_{197} by PDPH Conjugation Chemistry.

[0265] The PDPH conjugation chemistry is a multi-step process that involves activation of the polysaccharide, removal of the thiol protecting group, purification of the activated polysaccharide intermediate, activation and purification of the CRM_{197} protein, and conjugation of the activated components followed by purification. After introduction of a thiol group containing linker to the polysaccharide and a haloacetyl group to the CRM_{197} protein carrier, *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide was linked to the protein carrier through a thioether bond. Bromoacetyl groups were introduced into the CRM_{197} protein by reaction of amine groups with the N-hydroxysuccimide ester of bromoacetic acid. To generate thiolated polysaccharide, the carbodiimide activated carboxylate groups of *N*-acetylmannosaminouronic acid in the polysaccharide were coupled to the hydrazide group of the sulfhydryl-reactive hydrazide heterobifunctional linker 3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide (PDPH). Thiols of PDPH-thiolated polysaccharide, generated by reduction with DTT and purified by SEC on a Sephadex G25 column, reacted with bromoacetyl groups of activated protein resulting in covalent thioether linkage formed by bromine displacement between

polysaccharide and the carrier protein. Non-reacted bromoacetyl groups were "capped" with cysteamine hydrochloride (2-aminoethanethiol hydrochloride). The reaction mixture was then concentrated and diafiltered. The remaining unconjugated bromoacetyl groups were capped with cysteamine hydrochloride to ensure no reactive bromoacetyl groups were left after conjugation. This formed a covalent bond between the thiol end of cysteamine and the acetyl group on the lysine residue after displacement of bromine.

[0266] 1. *Thiolation of S. aureus Serotype 5 Capsular Polysaccharide with PDPH*: The polysaccharide was first activated by thiolation with PDPH. The polysaccharide was mixed with a freshly prepared PDPH stock solution (250 mg/mL in DMSO), an EDAC stock solution (90 mg/mL in diH_2O), and MES buffer stock solution (0.5M, pH 4.85) to make the final solution 0.1 M MES, and 2 mg and 4 mg capsular polysaccharide/mL while maintaining a capsular polysaccharde:PDPH:EDAC ratio by weight of 1:5:3 for serotype 5 capsular polysaccharide. This mixture was incubated for 1 hour at room temperature and then dialyzed against a 1000X volume of distilled H_2O four times using a 3500 MWCO dialysis device at between 4°C and 8°C to remove unreacted PDPH. The PDPH-linked polysaccharide was made 0.2 M DTT and incubated at room temperature for 3 hours or overnight at between 4°C and 8°C. Excess DTT as well as the by-products of the reaction were separated from the activated saccharide by SEC using Sephadex G25 resin and distilled water as the mobile phase. Fractions were assayed by the DTDP assay for thiol groups and thiol-positive fractions that eluted near the void volume of the column were pooled. The pool of fractions was assayed by the PAHBAH and the O-acetyl assays to determine the degree of activation, which is expressed as a molar percent of the repeat units containing a thiol group (molar concentration of thiols/molar concentration of repeat units). The activated polysaccharide was lyophilized and stored at -25°C until needed for conjugation.

[0267] The results from the reproducibility of serotype 5 polysaccharide thiolation with PDPH are shown in Table 15. Degree of activation of serotype 5 polysaccharide was in the range 11% to 19%, which corresponds to approximately

one linker molecule attached per ten capsular polysaccharide repeat units to one linker molecule per five repeat units.

Table 15: Activation of Serotype 5 Capsular Polysaccharide with PDPH – Reproducibility Study.

Serotype 5 polysaccharide-PDPH	Activation (% M_{SH}/M_{RU})	Scale mg	Yield mg (%, w/w)
1	11	23	19.6 (85)
2	13	30	28 (93)
3	19	30	23 (77)
4	15	32	29 (90)

[0268] 2. *Carrier protein activation*: Separately, the carrier protein was activated by bromoacetylation. CRM_{197} was diluted to 5 mg/mL with 10 mM phosphate buffered 0.9% NaCl pH 7 (PBS) and then made 0.1 M $NaHCO_3$ pH 7.0 using 1 M stock solution. The *N*-hydroxysuccinimide ester of bromoacetic acid (BAANS) was added at a CRM_{197} :BAANS ratio 1:0.25 (w:w) using a BAANS stock solution of 20 mg/mL DMSO. This reaction mixture was incubated at between 4 and 8°C for 1 hour then purified using SEC on Sephadex G-25. The purified activated CRM_{197} was assayed by the Lowry assay to determine the protein concentration and then diluted with PBS to 5 mg/mL. Sucrose was added to 5% wt/vol as a cryoprotectant and the activated protein was frozen and stored at -25°C until needed for conjugation.

[0269] Bromoacetylation of lysine residues of CRM_{197} was very consistent, resulting in the activation of 19 to 25 lysines from 39 lysines available (*see*, Table 16). The reaction produced high yields of activated protein.

Table 16: Yields and Degree of Bromoacetylation of CRM_{197}.

Preparation	Lysines Activated (n=)	Scale (mg)	Yield (% w/w)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87

Preparation	Lysines Activated (n=)	Scale (mg)	Yield (% w/w)
6	25	48	104

[0270] 3. *Coupling Reaction*: Once the activated capsule polysaccharide and activated carrier protein were prepared, the two were combined in a conjugation reaction. The lyophilized and thiolated polysaccharide was dissolved in 0.16 M borate pH 8.95, mixed with thawed bromoacetylated CRM_{197} and distilled water to make the final solution 0.1 M borate, 1:1 wt/wt ratio of CRM_{197}:polysaccharide, and 2 mg/mL serotype 5 capsular polysaccharide. This mixture was incubated at room temperature for between 16 and 24 hours. Unreacted bromoacetyl groups on the protein were capped by adding cysteamine hydrochloride at a ratio of CRM_{197}:cysteamine of 1:2 (wt/wt) using a 135 mg/mL stock solution of cysteamine dissolved in 0.1 M borate pH 8.95 and incubated for 4 hours at room temperature. The capsule polysaccharide-CRM_{197} conjugate (conjugate) was purified by diafiltering 50-fold against 0.9% NaCl using a 100K polyethersulfone ultrafilter.

[0271] The results from the reproducibility of serotype 5 capsular polysaccharide thiolation studies with PDPH demonstrated that the degree of activation was in the range of 11% to 19 %, which corresponds to approximately one linker molecule attached per ten CP repeat units to one linker molecule per five repeat units.

Conjugation of Serotype 5 Capsular Polysaccharide to CRM_{197} by CDT Conjugation Chemistry.

[0272] CDT affords a one-step conjugation process where the polysaccharide is activated in an anhydrous environment (DMSO) to form triazole carbamate moieties with available hydroxyls and acylimidazole or acyltriazole moieties with carboxylic acids. Addition of a protein carrier (in DMSO) leads to the nucleophilic displacement of the triazole by lysine and formation of a carbamate linkage (for activated hydroxyls) and the amide linkage (for activated carboxylic acids). The reaction solution is diluted 10-fold into an aqueous solution in preparation for purification by tangential flow filtration.

[0273] CDT conjugation chemistry produced serotype 5 capsular polysaccharide covalently linked to the carrier protein, which was indicated by the presence of the saccharide and protein in the fractions from size exclusion chromatography, and by amino acid analysis of glycolaldehyde capped or cysteamine hydrochloride capped conjugate.

[0274] A summary of the results from the preparation of several lots of conjugates prepared by both PDPH and CDT chemistries for serotype 5 capsular polysaccharide sizes in the range of 20 kDa to 40 kDa is shown in Table 17 below. There were no significant differences in the free capsule polysaccharide, ratio of polysaccharide:protein and yields of conjugates generated by these conjugation chemistries. The antigenicity of conjugated serotype 5 capsular polysaccharide was not altered by conjugation as portrayed by identity precipitin line between conjugates and native polysaccharide.

Table 17: Characterization of Serotype 5 Capsular Polysaccharide-CRM_{197} Prepared by Two Conjugation Chemistries.

Chemistry	CP Yield (%)	Protein Yield (%)	Output Ratio	Free sugar (%)	Free Protein (%)	Lysines Modified	Size (MW or Kd (% < 0.3), sacc/prot))
CDT	19-27	35	0.5-0.8	10-40	<1	18-22	38/61 to 76/74
PDPH	26-52	40-99	0.4-1.0	23-50	ND	ND	7.5×10^5 to 2.3×10^6

ND = not detected

[0275] As shown above, the methods described herein may be used to produce specific ranges of desired high molecular weight capsule polysaccharides. We sought to prepare conjugates from a pre-selected range of high molecular weight that could be filtered and purified serotype 5 capsular polysaccharide for use in immunogenic compositions. Table 18 summarizes the analysis of serotype 5 capsular polysaccharide conjugates where the serotype 5 capsule polysaccharide ranged in molecular weight from about 92 kDa to about 119 kDa and activated with triazole (CDT). The molecular weights of the resulting conjugates ranged from 1533 kDa to 2656. The number of conjugated lysines per CRM_{197} ranged from a high of 22 to a low of 15. The free capsule polysaccharide ranged from a high of 18% to a low of 11%.

Table 18: Conjugates With Preselected Molecular Weight Range of Serotype 5 Capsular Polysaccharide.

Run	Poly MW (kDa)	Yield (%)	Free Sacc. (%)	MW by SEC-MALLS (kDa)	Lysines Modified
1	121	63	11	2130	19
2	92	72	16	1533	22
3	119	74	14	2656	15
4	115	63	18	1911	15

[0276] Both conjugation chemistries produce serotype 5 capsular polysaccharide covalently linked to carrier protein. There were no significant differences in free capsule polysaccharide, ratio of serotype 5 capsular polysaccharide:protein and yields of conjugates generated by these two methods.

Example 11: Complex versus One-Pot CDT Processes.

[0277] As described above, methods for making the immunogenic conjugates of the invention involve covalent conjugation of the capsular polysaccharides with the carrier proteins using conjugation chemistry involving CDT (1,1-carboyl-di-1,2,4-triazole) or PDPH (3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide). Use of CDT resulted in a one-carbon or zero-carbon linker between capsular polysaccharide and carrier protein, while use of PDPH results in a five carbon linker containing covalent thioether bond between capsular polysaccharide and carrier protein.

[0278] The PDPH-based method was a multi-step process that involved activation of the polysaccharide, removal of a thiol protecting group on the polysaccharide, purification of the activated polysaccharide intermediate, activation and purification of the protein carrier, and conjugation of the activated components followed by purification. In this method, *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharides were reacted with PDPH and a carbodiimide in an organic solvent such as DMSO to produce PDPH-linked polysaccharides. The PDPH-linked polysaccharides were reacted with a reducing agent to produce activated polysaccharides that were then purified. Carrier proteins were reacted with bromoacetic acid in an organic solvent to produce activated carrier proteins that were then purified. The purified activated serotype 5 polysaccharides were

then reacted with the purified activated carrier proteins to produce serotype 5 polysaccharide:carrier protein conjugates.

[0279] In contrast, the CDT-based methods were one-step conjugation processes, in which the capsular polysaccharide was activated in an anhydrous environment (*i.e.*, DMSO) to form triazole carbamate moieties with available hydroxyls and acylimidazole or acyltriazole moieties with carboxylic acids. Addition of the protein carrier (in DMSO) lead to a nucleophilic displacement of the imidazole or triazole by lysine and formation of a carbamate linkage (for activated hydroxyls) and the amide linkage (for activated carboxylic acids), thereby permitting the conjugation to proceed in "one pot." Accordingly, two CDT-based methods were developed: a more complex process and a simpler one-pot process. In the more complex process, *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharides were compounded with imidazole or triazole and then reacted with CDT in an organic solvent (such as DMSO) and about 0.2% w/v water to produce activated serotype 5 polysaccharides. The activated serotype 5 polysaccharides were purified and then reacted with carrier proteins in the organic solvent to produce serotype 5 polysaccharide:carrier protein conjugates. The one-pot process was similar to the complex process except that the activated serotype 5 polysaccharides were not purified prior to the reaction with carrier proteins.

CDT Complex process

[0280] *Activation of Serotype 5 Capsular Polysaccharide*: Serotype 5 capsular polysaccharide was mixed with 10g triazole/g serotype 5 capsular polysaccharide and lyophilized. The resulting cake was dissolved in DMSO at 2.0 mg serotype 5 capsular polysaccharide/mL. The water content was determined and adjusted to 0.2%. A freshly prepared stock solution of CDT at 100 mg/mL in DMSO was added to achieve a 20 fold molar excess amount of CDT compared to the amount of CP5. Alternatively, the amount of CDT added may be adjusted to achieve a higher or lower degree of activation. This was held 30 minutes at 23°C.

[0281] *Purification of Activated Serotype 5 Capsular Polysaccharide*: The solution of activated serotype 5 capsular polysaccharide (ACP5) was poured into 25 volumes of water to destroy excess CDT. This was concentrated to its original volume on a 10 kDa PES membrane at approximately 1 mg/cm2 and diafiltered

against water for at least 10 volumes. This step was completed in less than 4 hours. The diafiltered material was mixed with 10 g triazole/g of original serotype 5 polysaccharide and lyophilized.

[0282] *Preparation of Lyophilized CRM*: CRM was diafiltered against 0.4% NaCl/5% sucrose at constant volume on a 10 kDa PES membrane for at least 10 volumes. The protein concentration was determined and sufficient diafiltration buffer was added to bring the protein concentration to 5.0 g/L, thus affording a w/w ratio of NaCl/CRM = 0.8. The CRM was lyophilized.

[0283] *Conjugation*: Activated, diafiltered serotype 5 capsular polysaccharide was dissolved in DMSO at 1 mg/mL. Borate solution at 100 mM was added to achieve 2% v/v.

[0284] CRM was resuspended at 2 mg/mL and, when dissolution was complete, combined with the ACP5 solution. This was allowed to react at 4°C for 20 hours.

[0285] The conjugate reaction was poured into 24 volumes of 5 mM borate pH 9.0 and allowed to stir at room temperature for 1 hour. It was then adjusted to pH 7.5 with 0.5 M phosphate buffer, pH 6.5. This was filtered through a 5 micron filter and concentrated to the original volume on a 300 kDa PES membrane at a load of ~ 1 mg/cm^2 and diafiltered against at least 10 volumes of water. The resulting concentrate was filtered through a 0.22 micron filter and stored at 2°C-8°C.

CDT One Pot Process

[0286] CRM_{197} *Matrix Exchange*: CRM_{197} was diafiltered to exchange from the bulk matrix of approximately 10 mM phosphate/80 mM NaCl/15% sucrose, pH 7 to 5 mM imidazole/0.72 % NaCl,/15 mM octyl-β-D-glucopyranoside, pH 7. The exchange allowed the removal of phosphate and sucrose which are detrimental to the conjugation and defines the sodium chloride content carried into the conjugation. Octyl-β-D-glucopyranoside is added prevent particle formation after sterile filtration.

The matrix of the CRM_{197} was exchanged by tangential flow filtration against 5 mM imidazole/0.72% Nacl/15 mM octyl-β-D-glucopyranoside, pH 7 through 10 diavolumes using 10K MWCO PES membranes at a retentate concentration of approximately 4 mg/mL. Typical membrane challenge was 2 grams/ft2 and the

target final CRM_{197} concentration in the matrix was 6 mg/mL. The CRM_{197} was stored at 2°C-8°C.

[0287] *Activation/Conjugation*: The activation/conjugation process for *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide consisted of the following steps: 1) Compounding of polysaccharide; 2) Shell freezing and lyophilization of CRM_{197} and compounded polysaccharide; 3) Dissolution of the lyophilized polysaccharide and CRM_{197}; 4) Activation of the polysaccharide; 5) Conjugation of the activated polysaccharide to CRM_{197}; and 6) Purification of the conjugate (dilution, diafiltration, sterile filtration).

[0288] The polysaccharide was compounded with 10 grams of 1,2,4- triazole excipient per gram of polysaccharide. The excipient was added as a power the polysaccharide, with a solution obtained after less than 15 minutes of mixing at ambient temperature.

[0289] The compounded polysaccharide and CRM_{197} were shell frozen separately using a -75°C ethanol bath. The volume per 1L bottle was approximately 500 mL.

[0290] For the polysaccharide dissolution, DMSO was added to the individual lyophilization bottles of the polysaccharide to obtain a suspension and then transferred to the activation/conjugation reaction vessel for heating. DMSO was added to obtain 2 g/L concentration. A clear solution was obtained after 5-10 minutes of mixing.

[0291] For the CRM_{197} dissolution, DMSO was added to the individual lyophylization bottles containing the CRM_{197} to obtain a suspension and then transferred to a second vessel for mixing. DMSO was added to obtain 2 g/L concentration. A clear solution was typically obtained in less than 15 minutes.

[0292] The polysaccharide/DMSO solution was sampled for Karl Fischer analysis to determine moisture content. CDT was prepared as a 100 mg/mL solution in DMSO and was added at a 5 molar excess to type 5 polysaccharide (the complex process used 20 molar equivalents CDT while the one-pot process used 5 molar equivalents CDT:CP5). Continuous addition of the CDT solution was performed over about 5 minutes at 23°C + 2°C with mixing. The reaction was allowed to proceed for a minimum of 30 minutes at 23°C ± 2°C. The reaction was

sampled to determine activation level (UV 220/205 nm) and then 100 mM sodium borate, pH 9 was added to obtain a 1.5% aqueous solution. The reaction solution was then stirred for a minimum of 30 minutes at 23°C + 2°C.

[0293] For conjugation of the activated polysaccharide to CRM_{197}, DMSO was added to target a 0.55 mg/mL reaction concentration. The dissolved CRM_{197} in DMSO was then added to the activated polysaccharide solution with mixing. The reaction was stirred for a minimum of 16 hours at 23°C + 2°C.

[0294] The reaction solution was 10X diluted with 5 mM sodium tetraborate, pH 8.6 to obtain a final diluted pH of 9 ± 0.2. The solution was stirred a 23 ± 3°C for a minimum of 4 hours. The diluted solution was passed through a 5 µm filter and concentrated to a target retentate concentration of 2 g/L. Tangential flow filtration was performed using 300K regenerated cellulose membranes through 20 diavolumes with 5 mM succinate, pH 7. Typical membrane challenge was 1 gram/ft2. The purified conjugate was passed through a 0.22 micron filter and stored at 2°C-8°C.

Example 12: Conjugation of Serotype 5 Capsular Polysaccharide Using One-Pot and Complex Conjugation Process.

[0295] This example demonstrates that pre-selected range of molecular weights of capsule polysaccharides can be used for conjugation in either the one -pot or complex process. The larger polysaccharides are initially produced by the bacterial cells and the resulting molecular weight range purified can be controlled by pH and heat of the hydrolysis process in Example 9. In this example, eight batches where the serotype 5 capsular polysaccharide ranged in molecular weight from about 90 kDa to about 140 kDa were selected and conjugation was performed using activation with triazole (CDT) in either the one-pot or complex processes described above. *See*, Table 19. The molecular weights of the resulting conjugates ranged from 1125 kDa to 2656 kDa. The number of conjugated lysines per CRM ranged from a high of 22 to a low of 15. The free sugar ranged from a high of 23% to a low of 11%.

57

Table 19: Serotype 5 Capsular Polysaccharide Conjugates Prepared with 90 kDa to 140 kDa Capsular Polysaccharides.

Process	Run	Poly MW (kDa)	Sacc Yield (%)	Free Sugar (%)	MW by SEC-MALLS (kDa)	Lysine
One Pot	1	142	93	11	1932	19
	2	108	93	14	1117	20
	3	142	85	17	1609	15
	4	108	86	23	1125	15
Complex	1	121	63	11	2130	19
	2	92	72	16	1533	22
	3	119	74	14	2656	15
	4	115	63	18	1911	15

Example 13: Serotype 5 Capsular Polysaccharide Conjugates Consistently Exhibit Protection in Murine Pyelonephritis Model.

[0296] Serotype 5 capsular polysaccharide conjugates were evaluated for their ability to protect mice in a pyelonephritis model. Bacterial counts in the blood of mice receiving i.p. *S. aureus* challenge were significantly reduced as compared to controls immunized with PBS.

[0297] All six individual studies showed a significant reduction in cfu/ml kidneys in immunized animals (Figure 9). When these studies were pooled for meta analysis, the overall significance for the studies as a whole increased to below 0.0001. The data showed consistent reduction of kidney colonization after active vaccinations with the capsular polysaccharide conjugate.

Example 14: Serotype 5 Capsular Polysaccharide Conjugates Prepared by Different Conjugation Chemistries Protect Mice Against Experimental Infections.

[0298] Active immunization studies in the murine pyelonephritis model were conducted with serotype 5 capsular polysaccharide conjugates prepared either by PDPH or CDT chemistry. The methods for conjugating capsular polysaccharides to CRM_{197} are described above. Results showed that both conjugates reduce colonization in mice compared to the sham immunized animals (Table 20).

Table 20: Effect of PDPH vs. CDT Conjugation on Protection Against *S. aureus* Challenge in Pyelonephritis Model.

Study #	Antigens	Strain/Dose	logCFU/Kidney	Significance
Study 1	Saline+$AlPO_4$	PFESA0266	5.53 ± 1.90	--
	1 mcg CP5-CRM (PDPH) +$AlPO_4$	2×10^8	3.01 ± 1.83	$p < 0.001$
	1 mcg CP5-CRM (CDT) +$AlPO_4$		1.67 ± 0.23	$p < 0.0001$
Study 2	Saline+$AlPO_4$	PFESA0266s	6.17 ± 1.76	--
	1 mcg CP5-CRM (PDPH) +$AlPO_4$	2.7×10^8	3.06 ± 1.69	$p < 0.0001$
	1 mcg CP5-CRM (CDT) +$AlPO_4$		1.87 ± 0.69	$p < 0.0001$

Example 15: Active Immunization of Serotype 5 Capsular Polysaccharide Conjugate Protects Rats in a Rat Endocarditis Model.

[0299] Four studies were conducted with CP5-CRM_{197} PDPH conjugate. The serotype 5 capsular polysaccharide conjugates significantly reduced recovered CFU after challenge with *S. aureus* PFESA0266 in both the heart and kidneys in 2 of 3 experiments (Table 21). In the third study, the Geometric Mean Titer (GMT) anti-CP5 titer was the lowest of the three experiments, but it was only slightly lower than in the previous experiment.

Table 21: Serotype 5 Capsular Polysaccharide-CRM_{197} Immunization Reduces CFU in a Rat Endocarditis Model.

		Log CFU Recovered		Significance		GMT
Immunogenic Composition	**Challenge Strain/Dose**	**Heart**	**Kidney**	**Heart**	**Kidney**	**CP Titer**
1 mcg CP5-CRM	PFESA0266	4.34± 1.78	3.92± 1.73			103,000
1 mcg PP5-CRM	2.21×10^8 cfu	7.94± 0.78	6.77± 0.79	p<0.001	p<0.05	
1 mcg CP5-CRM	PFESA0266	4.43± 2.30	3.11± 2.33			51,000
Saline	6.5×10^7 cfu	5.63± 2.48	4.19± 2.05	No	No	

		Log CFU Recovered		Significance		GMT
1 mcg CP5-CRM	PFESA0266	4.01± 2.49	3.90± 1.92			67,000
Saline	4.0 x 10^8 cfu	7.52± 1.38	6.52± 1.17	p<0.0002	p<0.0002	

Example 16: Enhanced Immunogenicity of HMW CP5 Conjugate Vaccines in Mice Compared to LMW CP5 Conjugate Vaccines

[0300] A murine pyelonephritis study was conducted to evaluate the immunogenicity and effectiveness of different CP5 conjugate formulations. Two formulations were tested: The first formulation was composed of a high molecular weight (HMW) CP5 (approximately 300 kDa) conjugated to CRM197. The second formulation contained a low molecular weight (LMW) CP5 (approximately 25 kDa) conjugated to CRM197. Three dose levels were tested for the HMW vaccine (1, 0.1 and 0.01 mcg). The LMW vaccine was tested at 1 mcg. A negative control group was also included composed of a polysaccharide conjugate vaccine derived from *Streptococcus pneumoniae* conjugated to CRM197 (PP5). Polysaccharides were formulated with 22mcg AlPO4 on weeks 0, 3 and 6 and challenged with *S. aureus* PFESA0266 on week 8. Kidneys were harvested and bacterial colonies enumerated 48 hours after challenge. Both vaccines were effective at generating an immune response and a reduction in CFUs of *S. aureus* PFESA0266 was observed from the kidneys of mice vaccinated with the 1 µg groups of both HMW and LMW vaccine. This was dosage dependent as demonstrated by reduced effectiveness from the lower vaccine dosages (Figure 10). The CFU readout was not sensitive enough to detect a difference in efficacy for the HMW and LMW vaccines. Sera from the mice were therefore tested by OPA. OPA titers were defined as the dilution of serum required to kill 40% of *S. aureus* Strain PFESA0266 in an OPA assay. Enhanced OPA titers were seen for the HMW vaccine compared to the LMW formulation (Figure 11).

Example 17: Capsule Polysaccharide Conjugates Comprising High Molecular Weight Polysaccharides Show Enhanced Immunogenicity Compared To Conjugates Comprising Low Molecular Weight Polysaccharides.

[0301] Non human primate (NHP) studies were conducted to evaluate the immunogenicity of different capsule conjugate formulations. Two formulations were tested at two different dosage levels (2 and 20 μg). The first formulation contained a high molecular weight (HMW) polysaccharide (approximately 130 kDa) conjugated to CRM_{197}. The second formulation contained a low molecular weight (LMW) polysaccharide (approximately 25 kDa) conjugated to CRM_{197}. Groups of five primates were vaccinated with a single dose of either vaccine and immune titers were monitored prior to vaccination and two weeks post vaccination. OPA titers were defined as the dilution of serum required to kill 40% of *S. aureus* Strain PFESA0266 in an OPA assay. Antibody titers were also monitored by ELISA. Enhanced activity was seen for the HMW vaccine compared to the LMW formulation (Table 22), evidenced by a ten fold rise in antibody titers for the HMW vaccine compared to the LMW vaccine. The OPA responder rate for the NHPs that received the HMW vaccine were also higher (80% compared to 40%).

Table 22. Enhanced Immunogenicity is observed for HMW polysaccharide conjugate vaccines compared to LMW polysaccharide conjugate vaccine.

	CP5-CRM197 dose level (mcg) per animal	Geometric Mean of PD1*	OPA Responder Rate (%)±
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

* Fold rise calculated from CP5 ELISA titer 2 weeks post vaccination compared to pre vaccine titers. ± Responder rate calculated from monkeys generating a rise in OPA titer following a single dose of vaccine 2 weeks post vaccination. Each group contained 5 Rhesus maccaques and vaccines were formulated with AlPO4 (250 mcg/dose)

Example 18: Polysaccharide O-Acetylation Is Important For Induction Of Protective Antibody Responses To Serotype 5 Capsular Polysaccharide Conjugate.

[0302] To evaluate the importance of O-acetylation of serotype 5 capsular polysaccharide, the native capsular polysaccharide was de-O-acetylated (dOAc) and conjugated to CRM_{197} (dOAc-CRM_{197}) using PDPH conjugation chemistry, as discussed above. The efficacy of dOAcCP-CRM_{197} conjugate was compared side-by-side with CP5-CRM_{197} in a murine pyelonephritis model.

[0303] Immunization with conjugates lacking O-acetyl groups (dOAc CP5-CRM) failed to reduce recovered bacterial CFU in the kidneys. These data (Table 23) indicate that O-acetylation is important for elicitation of functional antibodies against CP5.

Table 23: Immunization with De-O-Acetylated Serotype 5 Capsular Polysaccharide Conjugates Did Not Protect Mice from Kidney Colonization.

Study #	Antigens	Strain/Dose	LogCFU/Kidney	Significance
Study 1	1 mcg PP5-CRM	PFESA0266	3.89 ± 2.24	
	1 mcg dOAc CP5-CRM	7×10^8	4.20 ± 1.75	
	1 mcg CP5-CRM		1.75 ± 0.39	p-value < 0.008
Study 2	Saline	PFESA0266	5.08 ± 1.96	
	1 mcg dOAc CP5-CRM	2.4×10^8	5.89 ± 1.29	
	1 mcg CP5-CRM		2.93 ± 2.11	p-value < 0.02

Example 19: Confirmation of the Importance of O-Acetylation as Functional Epitope of Serotype 5 Capsular Polysaccharide By OPA Using Monoclonal Antibodies With Known Specificities.

[0304] Serotype 5 capsular polysaccharide monoclonal antibodies with specificities to OAc+ (CP5-7-1), OAc+/- (CP5-5-1) and OAc- (CP5-6-1) were evaluated for OP killing activity against the type 5 strain PFESA0266 (Table 24). Monoclonal antibodies to serotype 8 capsular polysaccharide (CP8-3-1 specific to CP8 OAc+) were used as negative control.

[0305] The OAc-specific anti-CP5 mAb CP5-7-1 mediated killing of *S. aureus* PFESA0266 (Table 24). Also monoclonal antibody CP5-5-1, which recognizes epitopes shared by both CP5 OAc+ and CP5 OAc-, mediated killing of the PFESA0266 strain. The monoclonal antibody specific for epitopes present on serotype 5 OAc- capsular polysaccharide did not mediate killing of the PFESA0266 strain. These results indicate that O-Acetyl epitopes on serotype 5 capsular polysaccharide are necessary to elicit functional activity of serotype 5-specific antibodies.

[0306] Antibodies need to be functional as measured by the killing of bacteria in an animal efficacy model or an opsonophagocytic killing assay that demonstrates the antibodies kill the bacteria. Functional killing may not be demonstrated using an assay that monitors the generation of antibodies alone, which is not indicative of the importance of O-acetylation in efficacy.

Table 24: Monoclonal Antibodies Specific to O-Acetylated (+) Serotype 5 Capsular Polysaccharide and O- and de-O-Acetylated (+/-) Serotype 5 Capsular Polysaccharide Are Opsonic Against *S. aureus* PFESA0266 (Type 5).

CP5-5-1 (O-Ac +/-) (mcg)				CP5-6-1 (O-Ac -) (mcg)				CP5-7-1 (O-Ac +) (mcg)				CP8-3-1 (-control) (mcg)			
20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5
28	33	30	21	-12	-5	-12	-5	31	46	49	55	-18	-3	-13	-5

Data reported as percent killing and was calculated by determining the ratio of the number of CFU surviving at 60 minutes in wells with bacteria, antibodies, complement and HL-60 cells to the number of CFU surviving in wells lacking antibodies but containing bacteria, complement and HL-60 cells.

Example 20: Enhanced Immunogenicity is Observed for CP5 Conjugates Composed of High Molecular Weight Polysaccharides Compared to Low Molecular Weight Polysaccharides in Non Human Primates (NHP).

[0307] Non human primate (NHP) studies were conducted to evaluate the immunogenicity of different capsule conjugate formulations. Two formulations were tested at two different dosage levels (2 and 20 μg). The first formulation was composed of a high molecular weight (HMW) polysaccharide (approximately 130

kDa) conjugated to CRM197. The second formulation contained a low molecular weight (LMW) polysaccharide (approximately 25 kDa) conjugated to CRM197. Groups of five primates were vaccinated with a single dose of either vaccine and immune titers were monitored prior to vaccination and two weeks post vaccination. OPA titers were defined as the dilution of serum required to kill 40% of S. aureus Strain PFESA0266 in an OPA assay. Antibody titers were also monitored by ELISA. Enhanced activity was seen for the HMW vaccine compared to the LMW formulation (Table 25). There was a three to ten fold rise in antibody titers for the HMW vaccine compared to the LMW vaccine. The OPA responder rate for the NHPs that received the HMW vaccine were also higher (80% compared to 40%).

Table 25: Enhanced Immunogenicity is observed for HMW polysaccharide conjugate vaccines compared to LMW polysaccharide conjugate vaccine.

	CP5-CRM197 dose level (mcg) per animal	Geometric Mean of PD1*	OPA Responder Rate (%)±
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

* Fold rise calculated from CP5 ELISA titer 2 weeks post vaccination compared to pre vaccine titers. ± Responder rate calculated from monkeys generating a rise in OPA titer following a single dose of vaccine 2 weeks post vaccination. Each group contained 5 Rhesus maccaques and vaccines were formulated with AlPO4 (250 mcg/dose)

SUMMARY

[0308] Both conjugation chemistries, described herein, produced serotype 5 capsular polysaccharide covalently linked to the carrier protein CRM197. There were no significant differences in free saccharide, ratio of serotype 5 polysaccharide:protein and yields of conjugates generated by these two methods.

[0309] All publications and patent applications mentioned in the specification are indicative of the level of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the

same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

[0310] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

What is Claimed is:

1. An immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, wherein:

a) the polysaccharide has a molecular weight of between 20 kDa and 1000kDa.

2. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the immunogenic conjugate has a molecular weight of between 200 kDa and 5000 kDa.

3. An immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, wherein:

a) the polysaccharide has a molecular weight of between 20 kDa and 1000kDa.

4. The immunogenic conjugate of claim 3, wherein the immunogenic conjugate has a molecular weight of between 200 kDa and 5000 kDa.

5. The immunogenic conjugate of any one of claims 1-4, wherein the polysaccharide has a molecular weight range of between 70 kDa and 300 kDa.

6. The immunogenic conjugate of any one of claims 1-5, wherein the conjugate has a molecular weight range of between 500 kDa and 2500 kDa.

7. The immunogenic conjugate of any one of claims 1-4, wherein the polysaccharide has a degree of O-acetylation between 10-100%

8. The immunogenic conjugate of claim 7, wherein the polysaccharide has a degree of O-acetylation between 50-100%.

9. The immunogenic conjugate of claim 7, wherein the polysaccharide has a degree of O-acetylation between 75-100%.

10. The immunogenic conjugate of any of claims 7-9, wherein the immunogenic conjugate can produce antibodies that are functional as measured by the killing of bacteria in either an animal efficacy model or an opsonophagocytic killing assay.

11. The immunogenic conjugate of any of claims 1-10, wherein the carrier protein is CRM_{197}.

12. The immunogenic conjugate of claim 11, wherein the CRM_{197} is covalently linked to the polysaccharide through a carbamate linkage, an amide linkage, or both.

13. The immunogenic conjugate of claim 11 or 12, wherein the molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} is about 10:1 to about 25:1.

14. The immunogenic conjugate of claim 13, wherein at least one covalent linkage between CRM_{197} and polysaccharide occurs at least at every 5 to 10 saccharide repeat units of the polysaccharide.

15. The immunogenic conjugate of claim 13 or 14, wherein at least one linkage between CRM_{197} and polysaccharide occurs at every 5 saccharide repeat units of the polysaccharide.

16. The immunogenic conjugate of any of claims 11-15, wherein the CRM_{197} comprises 5 to 22 lysines covalently linked to the polysaccharide.

17. The immunogenic conjugate of claim 16, wherein the CRM_{197} comprises 8 to 15 lysines covalently linked to the polysaccharide.

18. The immunogenic conjugate of any of claims 1-17 which comprises less than 30% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

19. The immunogenic conjugate of claim 18 which comprises less than 20% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

20. An immunogenic composition comprising the immunogenic conjugate of any of claims 1-19 and at least one of an adjuvant, diluent, or carrier.

21. The immunogenic composition of claim 20, wherein the adjuvant is an aluminum-based adjuvant.

22. The immunogenic composition of claim 21, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.

23. The immunogenic composition of claim 21, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

24. The immunogenic composition of any of claims 20-23 which comprises less than 30% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

25. The immunogenic composition of claim 24 which comprises less than 20% free type 5 or 8 polysaccharide compared to the total amount of type 5 or 8 polysaccharide.

26. A method of inducing an immune response to a *Staphylococcus aureus* serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharide conjugate in a subject, comprising administering to the subject an immunologically effective amount of the immunogenic composition of any of claims 20-25.

27. A method of producing an immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of:

a) reacting an isolated *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide with carbonyl ditriazole (CDT) in an organic solvent to produce an activated serotype 8 polysaccharide; and

b) reacting the activated serotype 8 polysaccharide with a carrier protein in an organic solvent to produce a serotype 8 polysaccharide:carrier protein conjugate;

wherein an immunogenic conjugate comprising a *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate is produced.

28. A method of producing an immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of:

a) reacting an isolated *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide with carbonyl ditriazole (CDT) in an organic solvent to produce an activated serotype 8 polysaccharide; and

b) reacting the activated serotype 5 polysaccharide with a carrier protein in an organic solvent to produce a serotype 5 polysaccharide:carrier protein conjugate;

wherein an immunogenic conjugate comprising a *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide-carrier protein conjugate is produced.

29. The method of claim 27 or claim 28, which further comprises:

lyophilizing the isolated polysaccharide; and re-suspending the lyophilized polysaccharide in an organic solvent.

30. The method of any one of claims 27-29 wherein the activated isolated polysaccharide is isolated from the activation reaction prior to reacting with the carrier protein.

31. The method of claim 30, wherein step b) comprises:

i) lyophilizing the isolated activated isolated polysaccharide to produce a lyophilized activated isolated polysaccharide;

ii) lyophilizing the carrier protein to produce a lyophilized carrier protein; and

iii) re-suspending the lyophilized activated isolated polysaccharide and the lyophilized carrier protein in an organic solvent to produce an activated isolated polysaccharide mixed with a carrier protein.

32. The method of any of claims 27-31, which further comprises dilution of the reaction mixture of step b) into a buffer and maintaining a pH of about 8.8 to about 9.2 for at least 4 hours at about 20°C to about 26°C.

33. The method of any of claims 27-31, which further comprises dilution of the reaction mixture of step b) into a buffer and maintaining a pH of about 9.0 for at least 4 hours at about 23°C.

34. The method of any of claims 27-33, further comprising isolating the *S. aureus* serotype capsular polysaccharide-carrier protein conjugate.

35. The method of any of claims 27-34, wherein the organic solvent is a polar aprotic solvent.

36. The method of claim 35, wherein the polar aprotic solvent is selected from the group consisting of dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide, *N*-methyl-2-pyrrolidone, and hexamethylphosphoramide (HMPA).

37. The method of claim 36, wherein the organic solvent is dimethyl sulfoxide (DMSO).

38. The method of any of claims 27 and 29-37 wherein the step of reacting the polysaccharide with CDT comprises determining the water present in the *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide and adjusting the CDT concentration to about 1:1 molar ratio of CDT:water in the organic solvent.

39. The method of any of claims 27 and 29-38 wherein the step of reacting the polysaccharide with CDT comprises determining the water present

in the *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide and adjusting the CDT concentration to about 0.5:1 molar ratio of CDT:water in the organic solvent.

40. The method of any of claims 27 and 29-38 wherein the step of reacting the polysaccharide with CDT comprises determining the water present in the *S. aureus* serotype capsular 8 polysaccharide and adjusting the CDT concentration to about 0.75:1 molar ratio of CDT:water in the organic solvent.

41. The method of any of claims 28-37, wherein the step of reacting the serotype 5 polysaccharide with CDT comprises providing about 20-fold molar excess of CDT compared to the polysaccharide.

42. The method of any of claims 28-37 and 41 wherein the serotype 5 polysaccharide CDT in an organic solvent mixture is adjusted to a water concentration between 0.1 and 0.3%.

43. The method of claim 42 wherein the water concentration is adjusted to 0.2%.

44. The method of any of claims 29-43, wherein the step of isolating the activated serotype polysaccharide comprises diafiltration.

45. The method of any of claims 27-44, wherein prior to lyophilization the carrier protein is diafiltered against NaCl and the w/w ratio of NaCl/protein carrier protein is adjusted to about 0.5 to about 1.5.

46. The method of any of claims 27-45, wherein the carrier protein is CRM_{197}.

47. The method of claim 46, wherein the activated serotype polysaccharide is reacted with the CRM_{197} in a ratio by weight of about 1:1.

48. The method of any of claims 27-47, wherein the isolated *S. aureus* serotype capsular polysaccharide is mixed with imidazole or triazole prior to mixing with CDT in an organic solvent.

49. The method of any of claims 27-48 which further comprises hydrolyzing the serotype polysaccharide-carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups.

50. A method of making an immunogenic conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of:

a) reacting a *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide with 3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide (PDPH) and a carbodiimide in an organic solvent to produce a PDPH-linked polysaccharide;

b) reacting the PDPH-linked polysaccharide with a reducing agent to produce an activated polysaccharide;

c) isolating the activated serotype 8 polysaccharide to produce an isolated activated serotype 8 polysaccharide;

d) providing an activated carrier protein;

e) reacting the isolated activated serotype 8 polysaccharide with the activated carrier protein to produce a serotype 8 polysaccharide-carrier protein conjugate; whereby an immunogenic conjugate comprising an isolated *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein is produced.

51. A method of making an immunogenic conjugate comprising an isolated *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, the method comprising the steps of:

a) reacting a *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide with 3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide (PDPH) and a carbodiimide in an organic solvent to produce a PDPH-linked polysaccharide;

b) reacting the PDPH-linked polysaccharide with a reducing agent to produce an activated polysaccharide;

c) isolating the activated serotype 5 polysaccharide to produce an isolated activated serotype 5 polysaccharide;

d) providing an activated carrier protein;

e) reacting the isolated activated serotype 5 polysaccharide with the activated carrier protein to produce a serotype 5 polysaccharide-carrier protein conjugate; whereby an immunogenic conjugate comprising an isolated *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein is produced.

52. The method of claim 50 or claim 51 wherein the activated carrier protein is isolated prior to reacting the activated carrier protein with the activated polysaccharide.

53. The method of any one of claims 50-52,wherein:

step c) further comprises lyophilizing the isolated activated serotype 8 polysaccharide to produce a lyophilized activated serotype polysaccharide.

54. The method of any of claims 50-53, wherein the organic solvent is a polar aprotic solvent.

55. The method of claim 54, wherein the polar aprotic solvent is selected from the group consisting of dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide, *N*-methyl-2-pyrrolidone, and hexamethylphosphoramide (HMPA).

56. The method of claim 55, wherein the polar aprotic solvent is dimethyl sulfoxide (DMSO).

57. The method of any of claims 50-56, wherein the carbodiimide is 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC).

58. The method of any of claims 50-57, wherein the step of reacting the serotype capsular polysaccharide with PDPH and EDAC in an organic solvent comprises maintaining a polysaccharide:PDPH:EDAC ratio by weight of about 1:5:3.

59. The method of any of claims 50-58, wherein the reducing agent is dithiothreitol (DTT).

60. The method of any of claims 50-59 wherein activation of the carrier protein comprises reacting the carrier protein with a bromoacetic acid.

61. The method of claim 60 wherein the bromoacetic acid comprises the N-hydroxysuccinimide ester of bromoacetic acid (BAANS).

62. The method of any of claims 50-61, wherein the step of isolating the activated serotype polysaccharide comprises diafiltration.

63. The method of any of claims 50-62 wherein the step of isolating the activated carrier protein comprises diafiltration.

64. The method of any of claims 50-63 which further includes the step of hydrolyzing the serotype polysaccharide-carrier protein conjugate to remove unreacted activation groups.

65. The method of claim 64 wherein the step of hydrolyzing the serotype polysaccharide-carrier protein conjugate comprises the addition of cysteamine hydrochloride.

66. The method of any of claims 50-65 which further comprises isolating the immunogenic conjugate comprising an isolated *S. aureus* serotype capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein.

67. The method of claim 66 wherein the isolation of the serotype polysaccharide:carrier protein conjugate comprises diafiltration.

68. The method of any of claims 50-67, wherein said carrier protein is CRM_{197}.

69. The method of claim 68, wherein the activated serotype polysaccharide is reacted with the CRM_{197} in a ratio by weight of about 1:1.

70. The method of any of claims 27-69 wherein the activated polysaccharide has a size between about 20 kDa and about 1000 kDa.

71. The method of claim 70, wherein the activated polysaccharide has a size between about 50 kDa and 500 kDa.

72. The method of any of claims 27-71 wherein the immunogenic polysaccharide-protein conjugate has a size between 400 kDa and about 5000 kDa.

73. An immunogenic conjugate produced by the method of any of claims 27-72.

74. The immunogenic conjugate of claim 73 which comprises more than about 1% free polysaccharide and less than about 30% free polysaccharide.

75. The immunogenic conjugate of claim 73 which comprises less than about 20% free polysaccharide.

76. An immunogenic composition comprising the immunogenic conjugate of any of claims 73-75 and at least one of an adjuvant, diluent, or carrier.

77. The immunogenic composition of claim 76, wherein the adjuvant is an aluminum-based adjuvant.

78. The immunogenic composition of claim 77, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.

79. The immunogenic composition of claim 78 wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

80. The immunogenic composition of any of claims 76-79 which comprises less than 30% free type polysaccharide compared to the total amount of type polysaccharide.

81. The immunogenic composition of claim 80 which comprises less than 20% free type polysaccharide compared to the total amount of type polysaccharide.

82. A *S. aureus* Type 8 capsular polysaccharide having a molecular weight of between 20 kDa and 1000 kDa covalently bound to a carrier protein; wherein the combined molecular weight of the polysaccharide covalently bound to the carrier protein is between about 200 kDa and 5000 kDa.

83. A *S. aureus* Type 5 capsular polysaccharide having a molecular weight of between 20 kDa and 1000 kDa covalently bound to a carrier protein; wherein the combined molecular weight of the polysaccharide covalently bound to the carrier protein is between about 200 kDa and 5000 kDa.

84. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of claim 82 or claim 83 wherein the polysaccharide has a molecular weight range of between 70 kDa and 300 kDa.

85. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of claim 82 or claim 83 that has a molecular weight range of between 500 kDa and 2500 kDa.

86. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of claim 82 or claim 83, wherein the carrier protein is CRM_{197}.

87. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of claim 86, wherein the CRM_{197} is covalently linked to the polysaccharide through a carbamate linkage, an amide linkage, or both.

88. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of claim 86 or claim 87, wherein the molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} is about 10:1 to about 25:1.

89. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of any one of claim 88, wherein at least one covalent linkage between CRM_{197} and

polysaccharide occurs at least at every 5 to 10 saccharide repeat units of the polysaccharide.

90. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of claim 88 or claim 89, wherein at least one linkage between CRM_{197} and polysaccharide occurs at every 5 saccharide repeat units of the polysaccharide.

91. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of any of claims 88-89 wherein the CRM_{197} comprises 5 to 22 lysines covalently linked to the polysaccharide.

92. The polysaccharide covalently bound to carrier protein of claim 91, wherein the CRM_{197} comprises 8 to 15 lysines covalently linked to the polysaccharide.

93. An immunogenic composition comprising the polysaccharide covalently bound to carrier protein of any of claims 82-92 and at least one of an adjuvant, diluent, or carrier.

94. The immunogenic composition of claim 93, wherein the adjuvant is an aluminum-based adjuvant.

95. The immunogenic composition of claim 94, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.

96. The immunogenic composition of claim 95, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

97. A method of reducing or preventing a Staphylococcal infection, disease or condition associated with a *Staphylococcus* bacteria in a subject, the method comprising the step of administering an immunologically effective amount of an immunogenic composition of any of claims 20-25 and 76-81 and 93-96 to the subject.

98. The method of claim 97, wherein the infection, disease or condition is selected from the group consisting of invasive *Staphylococcus aureus*, sepsis and carriage.

99. A method of reducing or preventing a Staphylococcal infection in a subject undergoing a surgical procedure, the method comprising the step of administering an immunologically effective amount of an immunogenic composition of any of any of claims 20-25 and 76-81 and 93-96 to the subject prior to the surgical procedure.

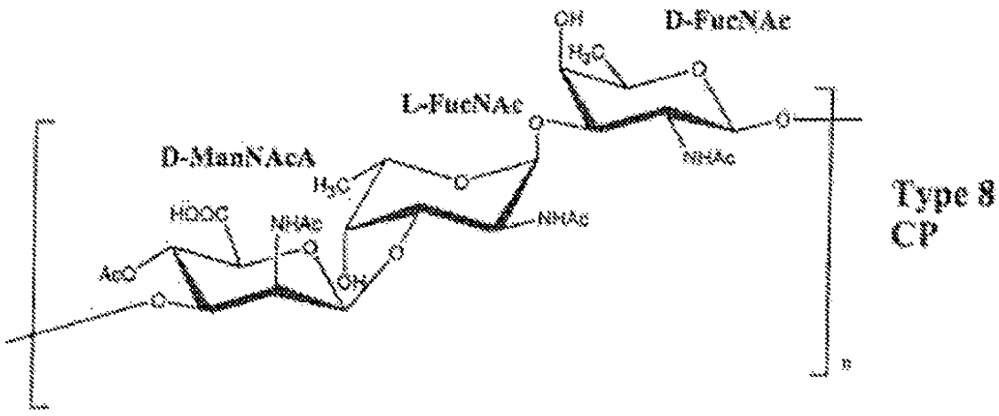
100. The method of any one of claims 97-99, wherein the subject is a human, a household pet, or a livestock animal.

101. A method of isolating *S. aureus* capsular polysaccharide with molecular weight from 20-1000 kDa comprising the step of subjecting a bacterial cell suspension to an acidic heat treatment.

102. An antibody generated by a capsular polysaccharide, an immunogenic conjugate, or an immunogenic composition of the present invention.

103. The antibody of claim 102, wherein the antibody is functional as measured by killing bacteria in an animal efficacy model or an opsonophagocytic killing assay.

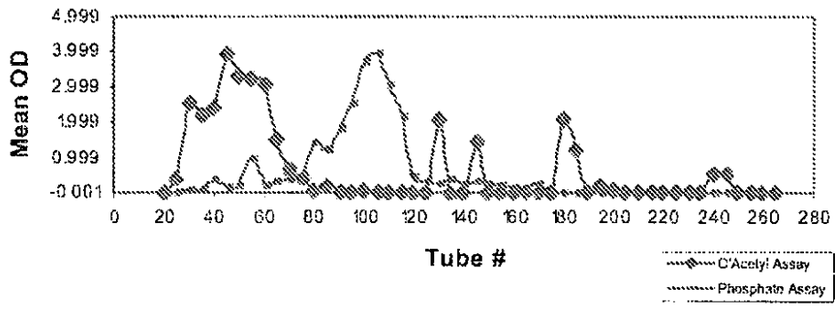
FIGURE 1



[-3)-β-D-ManNAcA(4-O-Ac)-(1-3)-α-L-FucNAc-(1-3)-α-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURE 2

A.


4.999
3.999
2.999
1.999
0.999
-0.001
Mean OD
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280
Tube #
C'Acetyl Assay
Phosphate Assay

B.

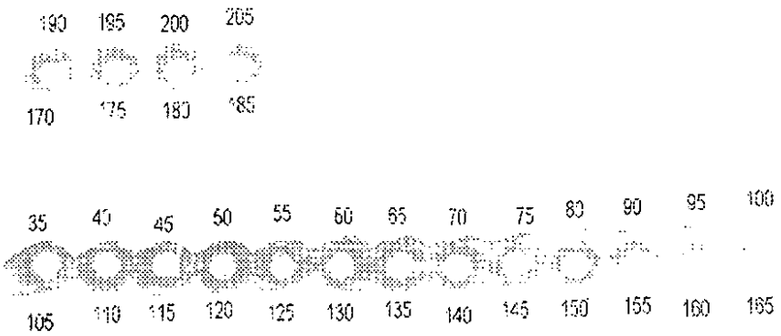
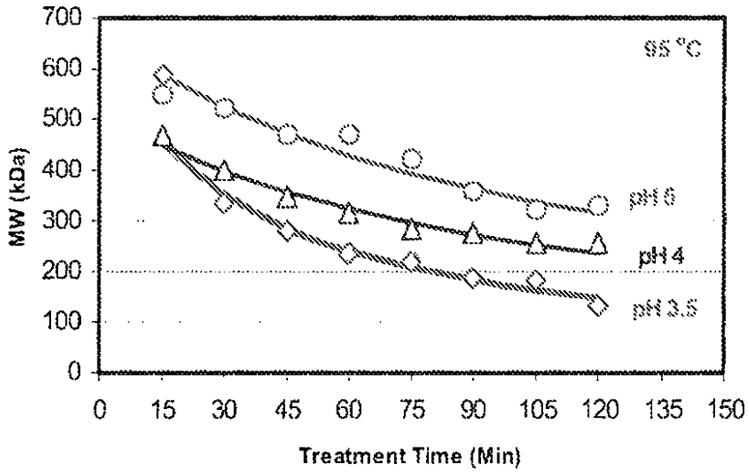

190 195 200 205
170 175 180 185
35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 90 95 100
105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165

FIGURE 3

A.


Effect of pH on CP-8 MW
700
600
500
400
300
200
100
0
MW (kDa)
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
Treatment Time (Min)
95 °C
pH 6
pH 4
pH 3.5

B.

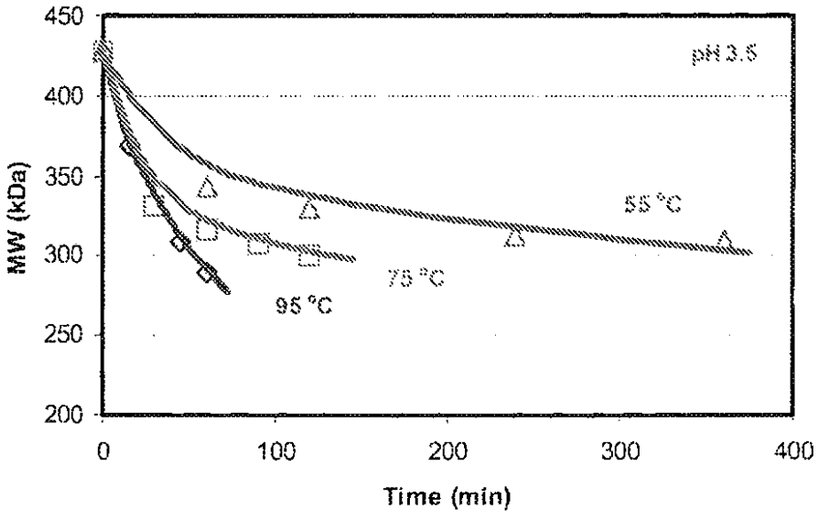

Effect of Temperature on CP-8 MW
450
400
350
300
250
200
MW (kDa)
0
100
200
300
400
Time (min)
pH 3.5
55 °C
75 °C
95 °C

FIGURE 4

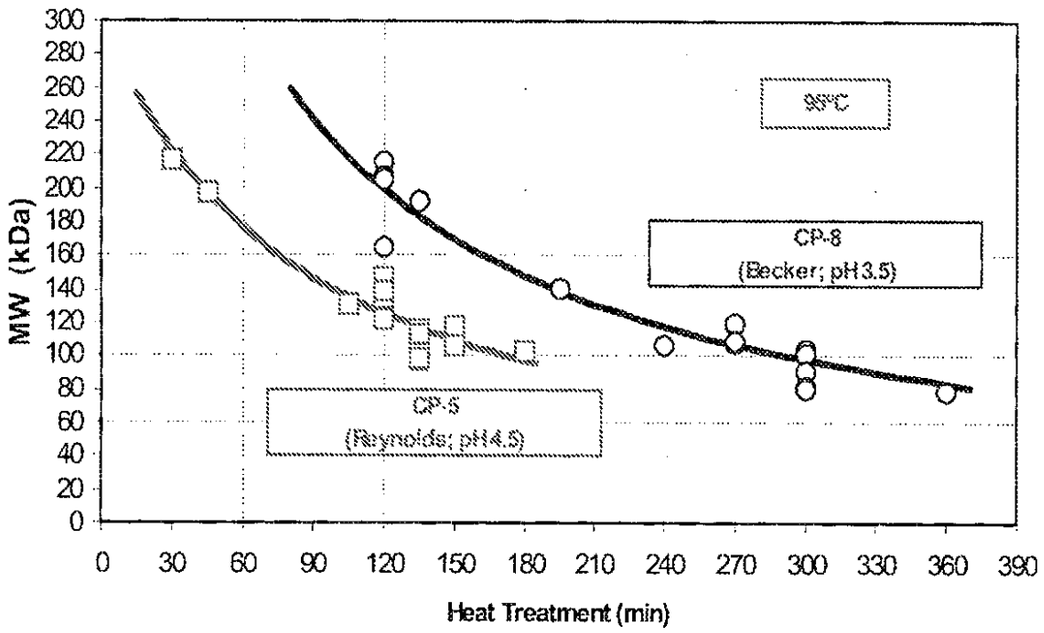

MW (kDa)
300
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
390
Heat Treatment (min)
95°C
CP-8
(Becker; pH 3.5)
CP-5
(Reynolds; pH 4.5)

FIGURE 5

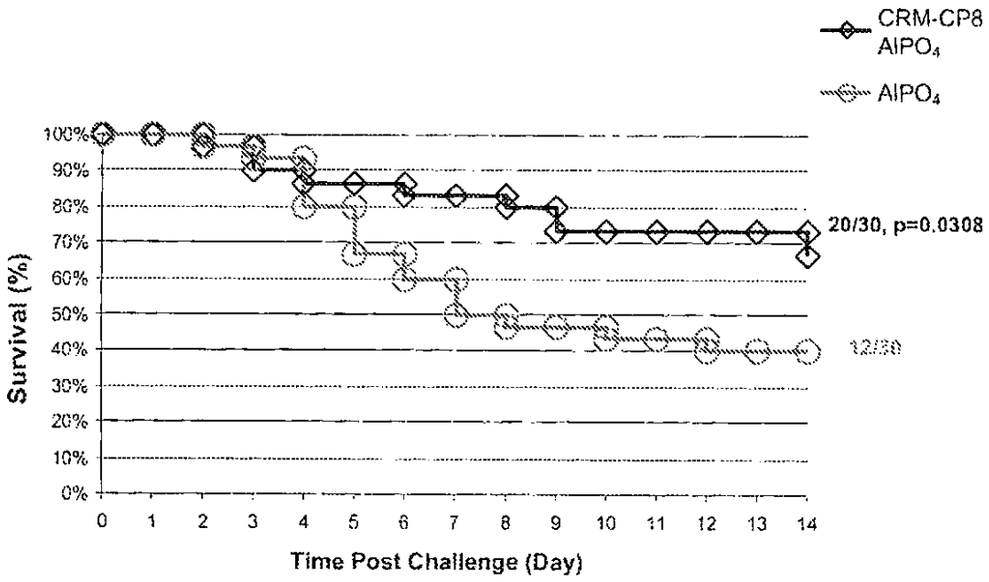
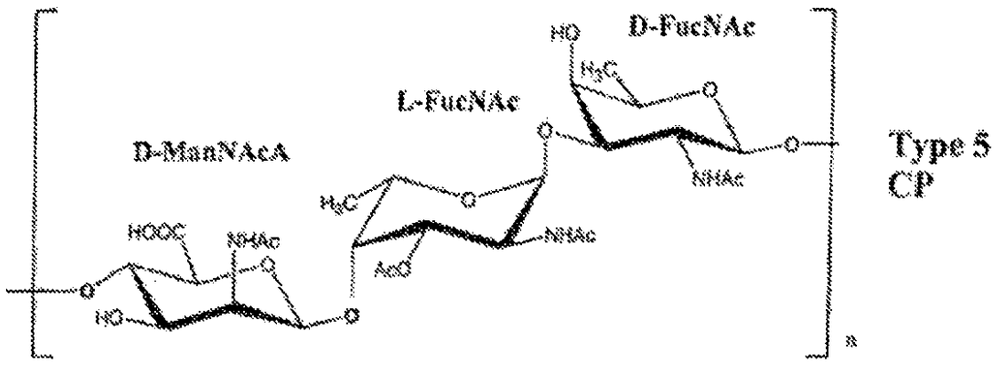

CRM-CP8 AlPO4
AlPO4
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Survival (%)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Time Post Challenge (Day)
20/30, p=0.0308
12/30

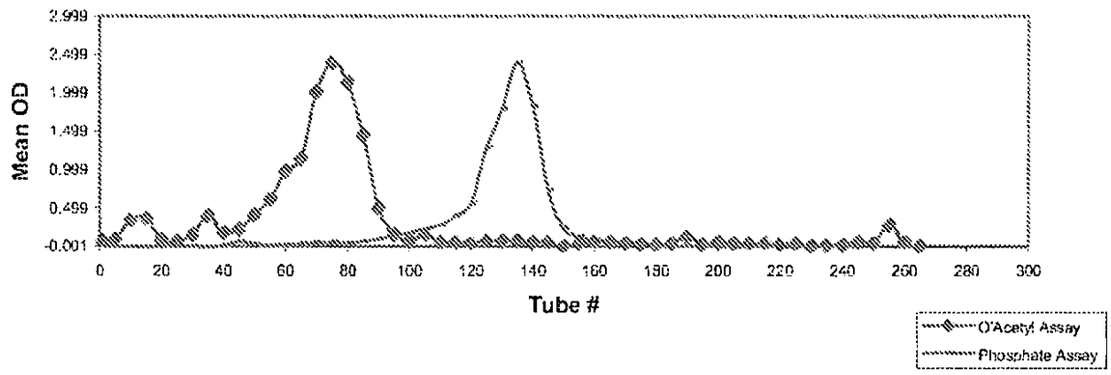
FIGURE 6



$]\text{-4)-}\beta\text{-D-ManNAcA-(1-4)-}\alpha\text{-L-FucNAc(3-O-Ac)-(1-3)-}\beta\text{-D-FucNAc-(1-]}_n$

FIGURE 7

A.


2.999
2.499
1.999
1.499
0.999
0.499
-0.001
Mean OD
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300
Tube #
O'Acetyl Assay
Phosphate Assay

B.

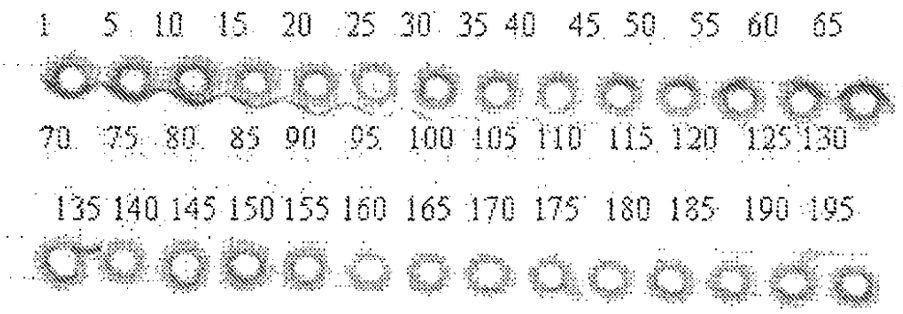
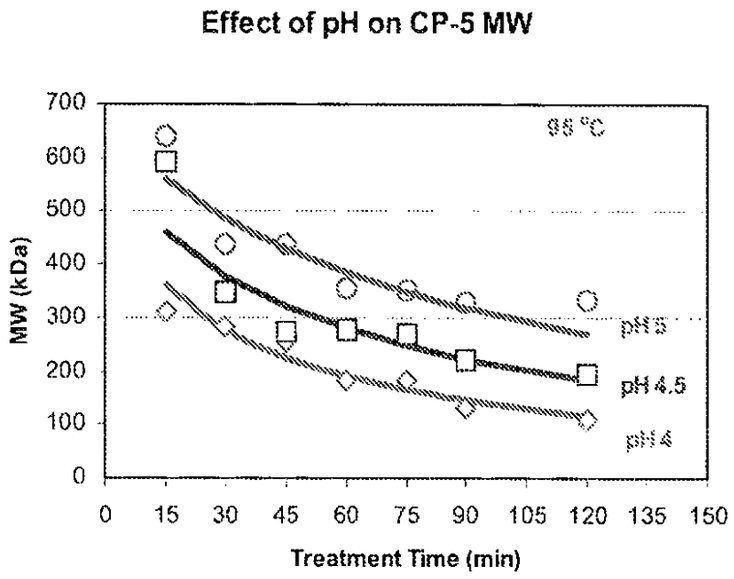

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130
135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195

FIGURE 8

A.


Effect of pH on CP-5 MW
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Treatment Time (min)
95 °C
pH 5
pH 4.5
pH 4

B.

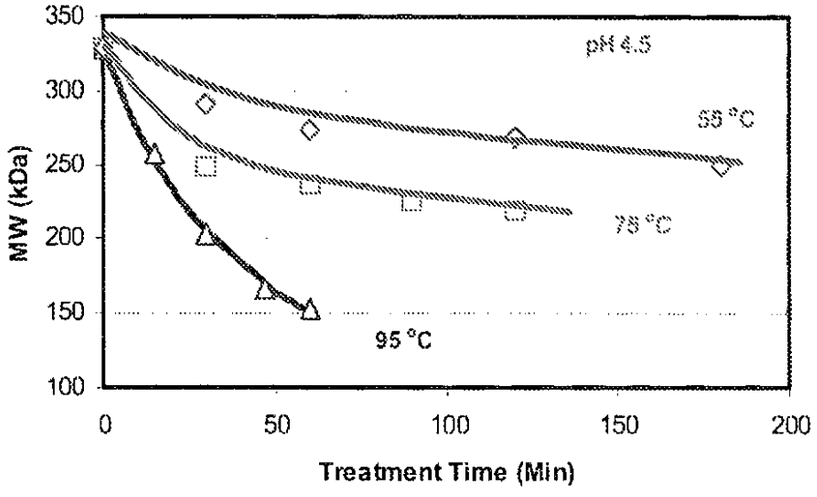
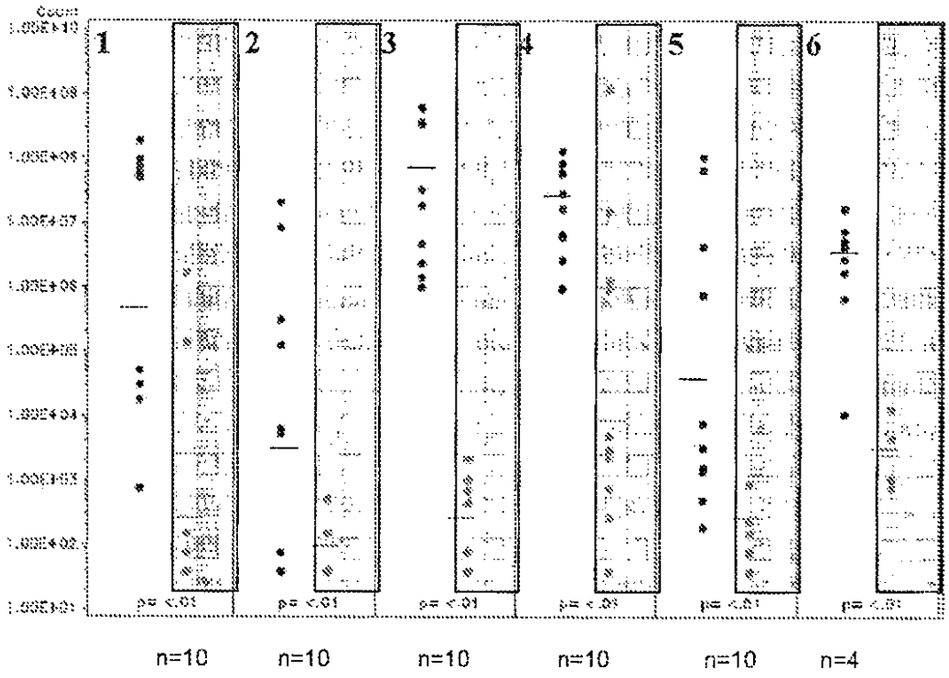

Effect of Temperature on CP-5 MW
MW (kDa)
350
300
250
200
150
100
0 50 100 150 200
Treatment Time (Min)
pH 4.5
55 °C
75 °C
95 °C

FIGURE 9



Meta analysis p= < 0.0001
Shaded area is serotype 5 polysaccharide conjugate-immunized group

FIGURE 10

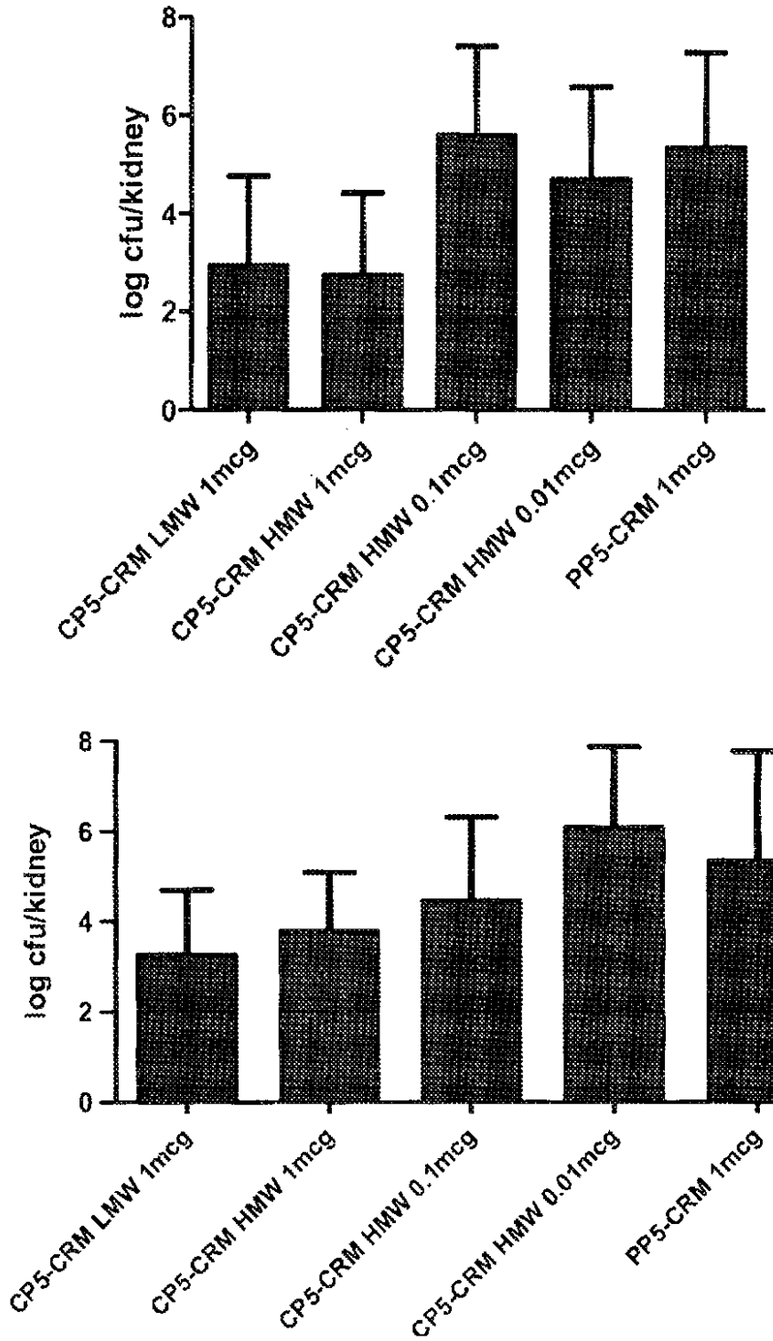
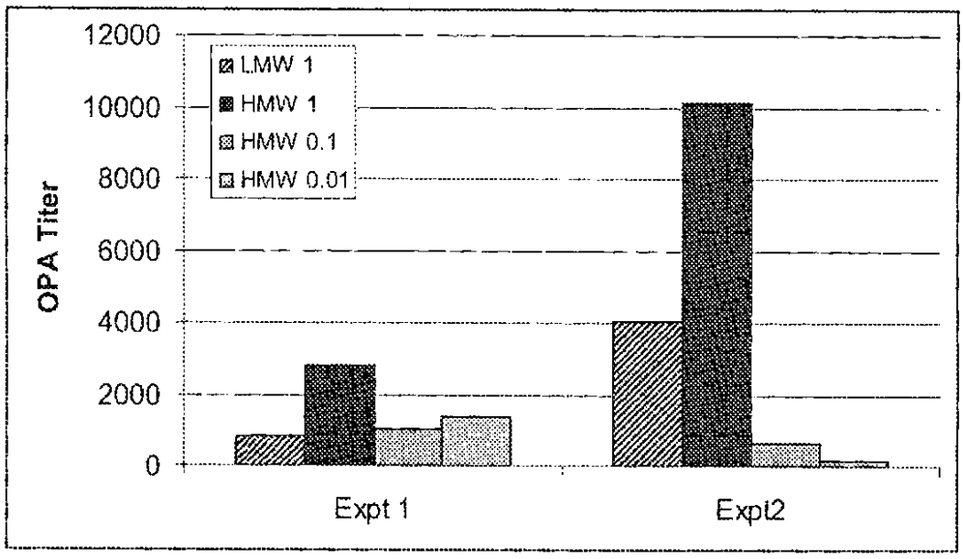

log cfu/kidney
0
2
4
6
8
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg
log cfu/kidney
0
2
4
6
8
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg

FIGURE 11


12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
OPA Titer
LMW 1
HMW 1
HMW 0.1
HMW 0.01
Expt 1
Expt2

COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE CONJUGADO DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 5 Y 8 DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Referencia cruzada a las Solicitudes Relacionadas

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de las Solicitudes de Patente Provisional de los Estados Unidos con n.ºs 61/219.143 y 61/219.151, presentadas el 22 de junio de 2009, la totalidad de cada una de las divulgaciones de las cuales se incorporan por la presente que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

Campo de la invención

[0001] La invención se refiere en general a composiciones inmunogénicas de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 y 8 de Staphylococcus aureus y procedimientos para su preparación y uso.

Antecedentes de la invención

[0002] Los seres humanos son un depósito natural para Staphylococcus aureus Gram positivas. Por ejemplo, S. aureus puede colonizar la piel, las fosas nasales y garganta, o bien permanentemente o bien de forma transitoria, sin dar lugar a enfermedad. Las infecciones por S. aureus varían entre infecciones de la piel leves y endocarditis, osteomielitis, bacteriemia y septicemia. S. aureus también da lugar a una mayoría de infecciones nosocomiales, y su prevalencia en infecciones de aparición en la comunidad va en aumento. Además, en 2005, las infecciones por S. aureus resistentes a meticilina (MRSA) se estimaron en 31,8 por 100.000 individuos, incluyendo 16.650 muertes en los Estados Unidos en 2005 (Klevens y col. (2007) J. Am. Med. Assoc. 298:1763 a 1771). Posteriormente tiene lugar la enfermedad

cuando los individuos están inmunocomprometidos debido a brechas en las barreras inmunitarias, tal como durante la cirugía, colocación de catéteres permanentes u otros dispositivos, traumatismo o heridas.

[0003] S. aureus produce un gran número de antígenos extra- y intracelulares, incluyendo numerosas toxinas y enzimas. De particular interés en el presente documento son los serotipos de polisacárido capsular de S. aureus (véase el documento de Karakawa & Vann, "*Capsular polysaccharides of Staphylococcus aureus*", en: Weinstein & Fields, eds. *Seminars in Infectious Diseases*. IV. Bacterial Vaccines. (Nueva York, NY; Thieme Stratton; 1982. págs. 285 a 293), especialmente polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8. Estudios epidemiológicos sobre un gran número de cepas de S. aureus aisladas a partir de individuos mostraron que de un 70 % a un 80 % fueron o bien polisacárido capsular de serotipo 5 o bien 8 (Arbeit y col. (1984) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:85 a 91). Desafortunadamente, los polisacáridos capsulares son pobres inmunógenos por sí mismos.

[0004] Las infecciones y enfermedades por estafilococos aumentaron dramáticamente en los últimos veinte años, tal como lo ha hecho el uso de dispositivos intravasculares y de procedimientos invasivos. El aumento en incidencia de enfermedad es más preocupante debido a un aumento paralelo de resistencia a antibióticos; por lo tanto, hay una necesidad urgente de composiciones inmunogénicas para evitar infecciones y enfermedades por estafilococos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0005] La presente invención se dirige hacia conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, y a procedimientos para fabricar tales conjugados. Los polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de S. aureus pueden obtenerse directamente a partir de las bacterias usando unos procedimientos de aislamiento conocidos por los expertos en la técnica, pueden producirse usando protocolos de síntesis, o pueden producirse de forma recombinante usando unos procedimientos de ingeniería genética también conocidos por los expertos en la técnica. Además, la presente invención proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria frente a una bacteria de estafilococo, procedimientos para prevenir una enfermedad causada por una bacteria de estafilococo, y procedimientos para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad causada por infección con una bacteria de estafilococo.

[0006] En una realización, la invención comprende un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, en el que el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa. En una realización, la parte de polisacárido del conjugado inmunogénico tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

[0007] En una realización, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 tiene un grado de O-acetilación de entre un 10 y un 100 %. En una realización, el grado de O-acetilación es de entre un 50 y un 100 %. En una realización, el grado de O-acetilación es de entre un 75 y un 100 %. En una realización, el conjugado inmunogénico genera un anticuerpo que es funcional tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0008] En una realización, la proteína de portador de conjugado inmunogénico comprende CRM_{197}. En una realización, la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos. En una realización, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1. En una realización, el conjugado comprende un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido para al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, el enlace entre la proteína de portador y el polisacárido tiene lugar en una de cada 5 unidades de repetición del polisacárido.

[0009] En una realización, el conjugado inmunogénico que comprende CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas o de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En una realización, el conjugado inmunogénico que comprende CRM_{197} comprende de 5 a 23 lisinas o de 8 a 12 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

[0010] En una realización, el conjugado inmunogénico comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 que es 10 a 100 % O-Acetilado. En una realización, el conjugado inmunogénico comprende un polisacárido de tipo 5

u 8 que es 50 a 100 % O-Acetilado. En una realización, el conjugado inmunogénico comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 que es 75 a 100 % O-Acetilado. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica puede usarse para generar unos anticuerpos que son funcionales en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0011] En una realización, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0012] En una realización, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0013] En una realización, la invención comprende una composición inmunogénica que comprende un conjugado inmunogénico tal como se describe en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

[0014] El adyuvante puede ser un adyuvante basado en aluminio, tal como uno o más de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, el adyuvante comprende fosfato de aluminio.

[0015] En una realización, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0016] En una realización, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0017] En una realización, la invención comprende un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria a un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus conjugado en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento.

[0018] En una realización, la invención comprende un procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus aislado con 1,1-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT) en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de serotipo 5 u 8 activado; y hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado con una proteína de portador en un disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador.

[0019] En una realización, el procedimiento de activación de polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus además comprende liofilizar el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado y volver a suspender el polisacárido liofilizado en un disolvente orgánico. En una realización, el polisacárido resuspendido se activa y a continuación se hace que reaccione directamente con la proteína de portador. En una realización, el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado se aísla antes de hacer que reaccione con la proteína de portador. En una realización, el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado aislado se liofiliza para producir un polisacárido de serotipo

5 u 8 aislado activado liofilizado antes de hacer que reaccione el polisacárido con la proteína de portador. En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína de portador comprende una etapa de liofilización de la proteína de portador para producir una proteína de portador liofilizada antes de hacer que reaccione la proteína de portador con el polisacárido. En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína de portador comprende la etapa de volver a suspender el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado liofilizado y la proteína de portador liofilizada en un disolvente orgánico como parte de la reacción del polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado con una proteína de portador.

[0020] En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de dilución de la mezcla de reacción de polisacárido activado y proteína de portador y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C.

[0021] En una realización, la mezcla de reacción de activado polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus y proteína de portador se mantiene a un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

[0022] En una realización, el procedimiento de producción de un polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado-proteína conjugado después de que éste se produce.

[0023] En una realización, el disolvente orgánico que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador es un disolvente aprótico polar. En una realización, el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína de portador el disolvente orgánico es DMSO.

[0024] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de ajustar la concentración acuosa de la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 5 y CDT en un disolvente orgánico a entre aproximadamente un 0,1 y un 0,3 %. En una realización, la concentración acuosa de la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 5 y CDT en un disolvente orgánico se ajusta a aproximadamente un 0,2 %.

[0025] En una realización, la etapa de activación de polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus aislado comprende hacer que reaccione el polisacárido con aproximadamente una cantidad de CDT que tiene un exceso molar de 20 con respecto a la cantidad de polisacárido presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 5 y CDT en un disolvente orgánico.

[0026] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de determinación de la concentración acuosa de la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8. En una

realización, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se prevé en aproximadamente una cantidad de CDT que es equimolar con respecto a la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico.

[0027] En una realización, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se prevé en aproximadamente una cantidad de CDT que tiene una razón molar de aproximadamente 0,5:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico. En una realización, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se prevé en aproximadamente una cantidad de CDT que tiene una razón molar de 0,75:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico.

[0028] En una realización, el procedimiento que comprende la etapa de aislamiento del polisacárido activado comprende la etapa de diafiltración.

[0029] En una realización, el procedimiento que comprende la liofilización de la proteína de portador, antes de la liofilización la proteína de portador se somete a diafiltración frente a NaCl y la razón en p/p de NaCl/proteína de portador de proteína se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5. En una realización, la razón de NaCl con respecto a proteína de portador es de aproximadamente 1.

[0030] En una realización, la proteína de portador que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende CRM_{197}.

[0031] En una realización, se hace que la CRM_{197} que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador reaccione con el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

[0032] En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de mezclado del polisacárido capsular de tipo 5 u 8 con imidazol o triazol antes del mezclado con CDT en un disolvente orgánico.

[0033] En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar.

[0034] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH) y una carbodiimida en un disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH; hacer que

reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado; aislar el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado para producir un polisacárido de serotipo 5 u 8 activado aislado; proporcionar una proteína de portador activada; hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado aislado con la proteína de portador activada para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador. En una realización, la proteína de portador activada se aísla antes de hacer que reaccione la proteína de portador activada con el polisacárido activado.

[0035] En una realización, la etapa de aislamiento de la proteína de portador activada además comprende liofilizar el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado aislado para producir un polisacárido de serotipo 5 u 8 activado liofilizado.

[0036] En una realización, el ácido bromoacético es un éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS).

[0037] En una realización, el procedimiento de producción de polisacárido capsular de serotipo 8-proteína de portador conjugado que utiliza PDPH comprende el uso de un disolvente orgánico que es un disolvente aprótico polar. En una realización, el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA), En una realización, el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO).

[0038] En una realización, la carbodiimida que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC).

[0039] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende la etapa de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 con PDPH y EDAC en un medio orgánico en una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de aproximadamente 1:5:3.

[0040] En una realización, el agente reductor que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC es ditiotreitol (DTT).

[0041] En una realización, la activación de la proteína de portador en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende hacer que reaccione la proteína de portador con un ácido bromoacético.

[0042] En una realización, la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo 5 u 8 activado en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende una diafiltración.

[0043] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar. En una realización, la etapa de hidrolización del

conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende la adición de clorhidrato de cisteamina.

[0044] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC además comprende aislar el conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

[0045] En una realización, el aislamiento del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende una diafiltración.

[0046] En una realización, la proteína de portador que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende CRM_{197}.

[0047] En una realización, la CRM_{197} en el procedimiento de producción de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-CRM_{197} conjugado que utiliza PDPH y EDAC se añade en una razón en peso de aproximadamente 1:1 de CRM_{197}:molécula de polisacárido capsular.

[0048] En una realización, el polisacárido capsular de tipo 5 u 8 activado que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC tiene un tamaño de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 500 kDa.

[0049] En una realización, el conjugado inmunogénico que se produce en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC tiene un

80

tamaño de entre aproximadamente entre 400 kDa y aproximadamente 5.000 kDa.

[0050] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 o 8-proteína de portador que se produce mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento.

[0051] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 o 8-proteína de portador que se produce mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente o portador. En una realización, las composiciones inmunogénicas comprenden un adyuvante basado en aluminio que puede seleccionarse del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento comprenden el adyuvante de fosfato de aluminio.

[0052] Las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento pueden comprender menos de un 30 % y menos de un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8. Las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento pueden almacenarse en agua o en un tampón de pH neutro de baja fuerza iónica.

[0053] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de reducción o de prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una bacteria de estafilococo en un sujeto,

comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma terapéutica o profiláctica de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento al sujeto. En una realización, la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en Staphylococcus aureus invasivo, septicemia y estado de portador.

[0054] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de reducción o de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma profiláctica de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

[0055] En una realización, el procedimiento de la invención comprende la sustitución de CDT por CDI.

[0056] En una realización, la invención proporciona un polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus que tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 800 kDa unido covalentemente a una proteína de portador; en el que el peso molecular combinado del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador es de entre aproximadamente 400 kDa y 5.000 kDa.

[0057] En una realización, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende una parte de polisacárido que tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa. En una realización, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

[0058] En una realización, la parte de proteína de portador del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende CRM_{197}. En una realización, la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos. En algunas realizaciones, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1. En algunas realizaciones, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende al menos un enlace covalente entre CRM_{197} al menos en cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido que tiene lugar en cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la CRM_{197} comprende de 5 a 23 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de comprende de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de comprende de 8 a 12 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

[0059] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 de S. aureus

unido covalentemente a la proteína de portador tal como se describe en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

[0060] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de administración de una composición inmunogénica que comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 de S. aureus unido covalentemente a la proteína de portador tal como se describe en el presente documento a un sujeto para generar una respuesta inmunitaria tal como se describe en el presente documento.

[0061] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de aislamiento de un polisacárido con un peso molecular entre 20 kDa y 1.000 kDa.

[0062] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo generado mediante un polisacárido capsular, un conjugado inmunogénico, o una composición inmunogénica de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0063] La presente invención se entenderá mejor y características, aspectos y ventajas diferentes de las que se exponen anteriormente se harán evidentes cuando se tengan en cuenta la siguiente descripción detallada de la misma. Tal descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en los que:

[0064] La figura 1 muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus (ácido N-acetil mannosaminurónico es ManNAca, N-acetil L-fucosamina es L-FucNAc, y N-acetil D-fucosamina es D-FucNAc).

82

[0065] La figura 2A muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus (ensayo de O-Acetilo) y ácido teicoico (ensayo de fosfato); la figura 2B muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus mediante ensayo de inmunodifusión doble.

[0066] La figura 3A muestra el efecto de pH (3,5, 4 o 5) a 95 °C tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus en un tratamiento térmico; la figura 3B muestra el efecto de la temperatura (55 °C, 75 °C o 95 °C) a un pH de 3,5 tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus en un tratamiento térmico.

[0067] La figura 4 muestra el peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus purificado en comparación con polisacárido capsular de serotipo 5 a lo largo del tiempo durante el tratamiento térmico a un pH de 3,5 y 4,5, respectivamente, y 95 °C.

[0068] La figura 5 muestra un aumento de la supervivencia en ratones que recibieron un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} (diamantes) en comparación con controles tratados con AlPO4 (círculos).

[0069] La figura 6 muestra una estructura de polisacárido de repetición de polisacárido de serotipo 5 de S. aureus (ácido N-acetil mannosaminurónico es ManNAcA, N-acetil L-fucosamina es L-FucNAc, y N-acetil D-fucosamina es D-FucNAcA).

[0070] La figura 7A muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido de serotipo 5 de S. aureus (ensayo de O-Acetilo) y ácido teicoico (ensayo de fosfato); la figura 7B muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido de serotipo 5 de S. aureus mediante ensayo de inmunodifusión doble.

[0071] La figura 8A muestra el efecto de pH (3,5, 4 o 5) a 95 °C tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus en un tratamiento térmico; la figura 8B muestra el efecto de la temperatura (55 °C, 75 °C o 95 °C) a un pH de 3,5 tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus en un tratamiento térmico.

[0072] La figura 9 muestra una reducción de pielonefritis en ratones que recibieron un polisacárido de serotipo 5-CRM_{197} conjugado en comparación con unos controles tratados con PBS (el área sombreada son los ratones tratados).

[0073] La figura 10 muestra unidades de formación de colonias (UFC) recuperadas en riñones después de una exposición a PFESA0266 de S. aureus en ratones vacunados con CP5-CRM de alto peso molecular (HMW), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW) o control de PP5-CRM

[0074] La figura 11 muestra una comparación de títulos de OPA (media geométrica) a partir de suero que se obtiene a partir de ratones vacunados con diferentes formulaciones de polisacárido conjugado (CP5-CRM de alto peso molecular (HMW), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW)). Los grupos consistieron en de 5 a 9 ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Visión de conjunto

[0075] La presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con proteínas portadoras y procedimientos para su preparación y uso. Características novedosas de los conjugados inmunogénicos de la invención incluyen los perfiles de peso molecular de los polisacáridos y de los conjugados resultantes, la razón de lisinas conjugadas por proteína de portador de CRM_{197} y el número de lisinas con enlace covalente con el polisacárido, el número de enlaces covalentes entre la proteína de portador y el polisacárido como una función de las unidades de repetición del polisacárido, y la cantidad relativa de polisacárido libre en comparación con el polisacárido total. La expresión "polisacárido libre" tal como se usa en el presente documento quiere decir un polisacárido que no está conjugado con la proteína de portador, pero que está, no obstante, presente en la composición de conjugado.

[0076] Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol), CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida). CDI es específico sólo para la conjugación de CP8. El uso de CDI/CDT da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador, mientras que el uso de PDPH da como resultado un enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

[0077] Agentes reticulantes adicionales para enlaces de -SH (CP tiolado) a -NH2 incluyen pero no se limitan a: sulfo-LC-SMPT; sulfo-LC-SMPT (4-sulfosuccinimidil-6-metil-a-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato)); sulfo-KMUS (éster de N-[k-maleimidoundecanoiloxi]sulfosuccinimida); sulfo-LC-SPDP (6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo) que se escinde por tioles; sulfo-SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo); sulfo-SIAB (N-sulfosuccinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato); sulfo-EMCS ([éster de N-e-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida); EMCA (ácido N-e-maleimidocaproico); sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo); sulfo-MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida); sulfo-GMBS (éster de N-[g-maleimidobutyriloxi]sulfosuccinimida); BMPA (ácido N-β-maleimidopropiónico); clorhidrato de 2-inmunotiolano; éster N-succinimidilíco del ácido 3-(2-piridilditio) propiónico; éster N-succinimidilíco del ácido 3-malemidopropiónico; éster N-succinimidilíco del ácido 4-maleimidobutírico; SMPT (4-succinimidiloxicarbonil-metil-a-[2-piridilditio]tolueno); LC-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxi-[6-amidocaproato] de succinimidilo); KMUA (ácido N-k-maleimidoundecanoico); LC-SPDP (6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo); SMPH (6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato de succinimidilo); SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo); SIAB (N-succinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato); EMCS (éster de [N-e-maleimidocaproiloxi]succinimida); SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo); MBS (éster m-maleimidobenzoílico de N-

hidroxisuccinimida); SBAP (3-[bromoacetamido]propionato de succinimidilo); BMPS (éster de N-[β-maleimidopropiloxi]succinimida); AMAS (éster de N-(a-maleimidoacetoxi) succinimida); SIA (yodoacetato de N-succinimidilo); y N-succinimidil (4-yodoacetil)-aminobenzoato.

[0078] Los agentes pueden también reticularse usando agentes reticulantes para grupos -SH a -OH. Tales agentes reticulantes incluyen pero no se limitan a PMPI (N-[p-maleimidofenil]isocianato).

[0079] Las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento son útiles en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, los conjugados pueden usarse en la producción de composiciones inmunogénicas de conjugado para proteger a los receptores frente a infecciones por S. aureus. Alternativamente, los varios conjugados pueden usarse en la producción de anticuerpos frente a polisacáridos capsulares bacterianos, que posteriormente pueden usarse en investigación y en ensayos clínicos de laboratorio, tal como serotipado y detección bacteriana. Tales anticuerpos pueden usarse también para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos que se producen frente a polisacáridos bacterianos son funcionales o bien en un modelo de eficacia animal o bien en un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0080] A menos que se defina de otro modo, todas las expresiones técnicas y científicas que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la técnica a la que se refiere la invención. A pesar de que cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento pueden usarse en la práctica o realización de pruebas de la

presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen en el presente documento. En la descripción de las realizaciones y reivindicaciones de la invención, cierta terminología se usará de acuerdo con las definiciones que se exponen a continuación.

[0081] Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento y/o que se harán evidentes para un experto en la técnica tras la lectura de la presente divulgación, etcétera.

[0082] Tal como se usa en el presente documento, "aproximadamente" quiere decir dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor tal como un intervalo de concentraciones, marco de tiempo, peso molecular, temperatura o pH indicados. Un intervalo de este tipo puede estar dentro de un orden de magnitud, habitualmente dentro de un 20 %, más habitualmente aún dentro de un 10 %, y incluso más habitualmente dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado. La variación admisible abarcada por la expresión "aproximadamente" dependerá del sistema particular sometido a estudio, y puede apreciarse fácilmente por un experto en la técnica. Siempre que se menciona un intervalo dentro de la presente solicitud, cada número entero en su totalidad dentro del intervalo se contempla también como una realización de la invención.

[0083] Se observa que en la presente divulgación, expresiones tales como "comprende", "comprendido/a", "comprendiendo/ que comprende", "contiene", "conteniendo/ que contiene" y similares pueden tener el

significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos; por ejemplo, éstas pueden significar "incluye", "incluído/a", "incluyendo/ que incluye" y similares. Tales expresiones se refieren a la inclusión de unos componentes particulares o conjunto de componentes sin excluir cualesquiera otros componentes. Expresiones tales como "consistiendo/ que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos, por ejemplo, éstas permiten la inclusión de componentes o etapas adicionales que no restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, es decir, éstas excluyen componentes o etapas no mencionados adicionales que restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, y éstas excluyen componentes o etapas de la técnica anterior, tal como documentos en la técnica que se indican en el presente documento o se incorporan por referencia en el presente documento, especialmente debido a que es un objetivo del presente documento definir unas realizaciones que pueden patentarse, por ejemplo, novedosas, no obvias, de la invención, sobre la técnica anterior, por ejemplo, sobre los documentos que se indican en el presente documento o que se incorporan por referencia en el presente documento. Y, las expresiones "consiste en" y "consistiendo/ que consiste en" tienen el significado que se atribuye a éstas en la ley de patentes de los Estados Unidos; a saber, que estas expresiones son cerradas. Por consiguiente, estas expresiones se refieren a la inclusión de un conjunto de componentes o un componente particular y a la exclusión de todos los otros componentes.

Conjugados inmunogénicos

[0084] Tal como se describe anteriormente, la presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con proteínas portadoras. Una realización de la invención proporciona conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína o molécula portadora que tiene una o más de las siguientes características: el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 700 kDa; el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa; y el conjugado comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total. En algunas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa. En algunas realizaciones el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa. En otras realizaciones, el conjugado comprende menos de aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 5 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total.

[0085] Los "conjugados" tal como se usan en el presente documento, comprenden un polisacárido de cápsula normalmente de un intervalo deseado de peso molecular y una proteína de portador, en el que el polisacárido de cápsula está conjugado con la proteína de portador. Los conjugados pueden o pueden no contener alguna cantidad de polisacárido de cápsula libre. Tal como se usa en el presente documento, "polisacárido de cápsula libre" se refiere a un polisacárido de cápsula que está asociado no covalentemente con (es decir, está unido no covalentemente a, adsorbido

a o atrapado en o con) el polisacárido capsular-proteína de portador conjugado. Las expresiones "polisacárido de cápsula libre", "polisacárido libre" y "sacárido libre" pueden usarse de forma intercambiable y se pretende que transmitan el mismo significado.

[0086] Con independencia de la naturaleza de la molécula portadora, esta puede conjugarse con el polisacárido capsular o bien directamente o bien a través de un ligador. Tal como se usa en el presente documento, "(para) conjugar", "conjugado/a" y "conjugando" se refieren a un procedimiento mediante el cual un polisacárido capsular bacteriano se une covalentemente a la molécula portadora. La conjugación aumenta la inmunogenicidad del polisacárido capsular bacteriano. La conjugación puede realizarse de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación o mediante otros procedimientos que se conocen en la técnica.

[0087] El peso molecular del polisacárido capsular de S. aureus es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular son capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpo debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. El aislamiento de los "polisacáridos capsulares de alto peso molecular" se contempla para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención. En una realización de la invención, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 20 kDa a 1.000 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 50 kDa a 700 kDa en peso molecular. En una

realización de la invención, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 50 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 250 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular. Otros intervalos de polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular que puede aislarse y purificarse mediante los procedimientos de la presente invención incluyen de 70 kDa a 100 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 140 kDa en peso

molecular; de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 160 kDa en peso molecular; y intervalos deseados similares de peso molecular. Cualquier número entero en su totalidad dentro de cualquiera de los intervalos anteriores se contempla como una realización de la invención.

[0088] En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 5.000 kDa en peso molecular. En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 5.000 kDa en peso molecular. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 600 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 700 kDa y aproximadamente 2.700 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 2.000 kDa; de entre aproximadamente 1.800 kDa y aproximadamente 2.500 kDa; de entre aproximadamente 1.100 kDa y aproximadamente 2.200 kDa; de entre aproximadamente 1.900 kDa y aproximadamente 2.700 kDa; de entre aproximadamente 1.200 kDa y aproximadamente 2.400 kDa; de entre

aproximadamente 1.700 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.300 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.600 kDa y aproximadamente 3.000 kDa. Cualquier número entero en su totalidad dentro de cualquiera de los intervalos anteriores se contempla como una realización de la invención

[0089] Tal como se usa en el presente documento, "inmunogénica" quiere decir una capacidad de un antígeno (o un epítopo del antígeno), tal como un polisacárido capsular bacteriano o un composición inmunogénica de conjugado que comprende el antígeno, para provocar una respuesta inmunitaria en un huésped tal como un mamífero, o bien mediada de forma celular o bien humoral, o ambas. Por consiguiente, "conjugado inmunogénico" o "conjugado" tal como se usa en el presente documento quiere decir cualquier conjugado inmunogénico con contenido en un antígeno o determinante antigénico (es decir, epítopo) de un polisacárido capsular bacteriano conjugado con una molécula portadora que puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria. El conjugado inmunogénico puede servir para sensibilizar el huésped mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas de CMH en una superficie celular. Además, pueden generarse unas células T o anticuerpos específicos de antígeno para permitir la protección futura de un huésped inmunizado. Los conjugados inmunogénicos pueden por lo tanto proteger al huésped frente a uno o más síntomas asociados con una infección por bacterias, o puede proteger al huésped frente a muerte debida a la infección con bacterias asociadas con el polisacárido capsular. Los conjugados inmunogénicos pueden usarse también para generar unos anticuerpos policlonales o

98

monoclonales, que pueden usarse para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. Los conjugados inmunogénicos pueden usarse también para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0090] Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unión específica a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, que se encuentra en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otro modo por el contexto, se pretende que la expresión abarque no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos diseñados por ingeniería genética (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivados para efectuar funciones de efector, estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), anticuerpos de cadena única (ScFv) y de dominio, lo que incluye anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos a condición de que éstos exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpo tal como se describe en el presente documento, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o subclase de los mismos), y el anticuerpo no ha de ser de ninguna clase particular.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse inmunoglobulinas a clases diferentes. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2 en los seres humanos. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0091] Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte preferentemente retiene al menos una, preferentemente la mayor parte o la totalidad, de las funciones que se asocian normalmente con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto.

[0092] La expresión "antígeno" en general se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido o conjugado en una composición inmunogénica, o sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de células T, o ambas, en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria puede generarse frente a la totalidad de la molécula, o frente a varias partes de la molécula (por ejemplo, un epítopo o hapteno). La expresión puede usarse para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno se reconoce por anticuerpos, receptores de células

T u otros elementos de inmunidad humoral y/o celular específica. El "antígeno" también incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos de un antígeno dado pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de asignación de epítopos, que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols* en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Human Press, Totowa, N.J. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando de forma concurrente un gran número de péptidos en soportes sólidos, correspondiéndose los péptidos con partes de la molécula de proteína, y hacer que reaccionen los péptidos con anticuerpos a la vez que los péptidos están aún unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998 a 4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709 a 715; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. De forma similar, los epítopos conformacionales pueden identificarse determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, citado anteriormente. Además, para los fines de la presente invención, "antígeno" también puede usarse para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tal como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa, si bien éstas pueden ser no conservativas), en la secuencia nativa, a condición de que la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta

inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de una mutagénesis dirigida al sitio, o a través de unos procedimientos de síntesis particulares, o a través de un enfoque de ingeniería genética, o pueden ser accidentaels, tal como a través de mutaciones de huéspedes, que producen los antígenos. Además, el antígeno puede derivarse, obtenerse, o aislarse a partir de un microbio, por ejemplo, una bacteria, o puede ser la totalidad de un organismo. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, se incluye también en la definición. También se incluyen los antígenos de síntesis, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos derivados de forma sintética o recombinante (Bergmann y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann y col. (1996) J. Immunol. 157:3242 a 3249; Suhrbier (1997) Immunol. Cell Biol. 75:402 408; Gardner y col. (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, de 28 de Junio a 3 de Julio de 1998).

[0093] Una respuesta inmunitaria "de protección" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para provocar una respuesta inmunitaria, o bien mediada de forma celular o bien humoral, o ambas, que sirve para proteger a un sujeto frente a una infección. La protección que se prevé no ha de ser absoluta, es decir, la infección no ha de evitarse o erradicarse totalmente, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control de sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se administró la vacuna o composición inmunogénica. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o rapidez de aparición de los síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunitaria de

protección" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En situaciones particulares, una "respuesta inmunitaria de protección" podría incluir la inducción de un aumento del doble en los niveles de anticuerpos o de un aumento de cuatro veces en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En ciertas realizaciones, la opsonización de anticuerpos está relacionada con una respuesta inmunitaria de protección. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria de protección puede someterse a ensayo midiendo la disminución en porcentaje en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo, los que se describen a continuación. Preferentemente, hay una disminución en el recuento de bacterias de al menos un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 65 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más. La "cantidad inmunogénica" de un conjugado particular en una composición se dosifica en general en base al polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 conjugado con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 mcg de polisacárido no conjugado en una dosis de 100 mcg. La contribución de la proteína al conjugado no se considera normalmente cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 mcg de

polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg, y más en particular de 1 a 10 mcg.

[0094] La expresión "sujeto" se refiere a un mamífero, pájaro, pez, reptil, o cualquier otro animal. La expresión "sujeto" también incluye seres humanos. La expresión "sujeto" también incluye mascotas domésticas. Unos ejemplos no limitantes de mascotas domésticas incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, gerbos, hámsteres, cobayas, hurones, pájaros, serpientes, lagartos, peces, tortugas, y ranas. La expresión "sujeto" también incluye animales de ganado. Unos ejemplos no limitantes de animales de ganado incluyen: alpaca, bisonte, camello, ganado bovino, ciervo, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, reno, yak, gallinas, gansos, y pavos.

[0095] Tal como se muestra en la figura 1, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8 de S. aureus tienen las siguientes estructuras: serotipo 5 [→4)-β-D-ManNAcA-(1→4) -3-O-Ac -α-L-FucNAc-(1→3)-β-DFucNAc-(1→]n. y serotipo 8 [→3)-4-O-Ac-β-D-ManNAcA-(1→3)-α-L-FucNAc-(1→3)-β-DFucNAc-(1→]n. Véase el documento de Jones (2005) Carbohidr. Res. 340:1097 a 1106. El polisacárido capsular de serotipo 8 tiene unas unidades de repetición de trisacárido similares a las del polisacárido capsular de serotipo 5; no obstante, éstos se diferencian en los enlaces de azúcar y en los sitios de O-acetilación, que producen unos patrones serológicamente diferentes de inmunoreactividad (Fournier y col. (1984) Infect. Immun. 45:87 a 93; y Moreau y col. (1990) Carbohidr. Res. 201:285 a 297). Los polisacáridos capsulares de serotipo 8 y 5 son por lo tanto carbohidratos relativamente complejos que son solubles en agua, normalmente ácidos, y

se pensó anteriormente que tenían unos pesos moleculares de aproximadamente 25 kDa (Fattom (1990) Infect. Immun. 58, 2367 a 2374).

[0096] En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y/o 8 de la invención son O-acetilados. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de oligosacárido o polisacárido capsular de tipo 5 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, 50- 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de oligosacárido o polisacárido capsular de tipo 8 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, de un 50 a un 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de los oligosacáridos o polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, de un 50 a un 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %.

[0097] El grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante una RMN de protones (Lemercinier y Jones 1996, Carbohidrate Research 296; 83 a 96, Jones y Lemercinier 2002, J Pharmaceutical y Biomedical analysis 30; 1233 a 1247, documentos WO

05/033148 o WO 00/56357). Otro procedimiento que se usa normalmente se describe por Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249 a 261.

[0098] En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y/o 8 de la invención se usan para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que supervisa la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

[0099] Los polisacáridos capsulares tales como de serotipo 5 u 8 pueden obtenerse directamente a partir de bacterias usando unos procedimientos de aislamiento conocidos por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Fournier y col. (1984), citado anteriormente; Fournier y col. (1987) Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:561 a 567; publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos con n.° 2007/0141077; y la publicación de solicitud de patente internacional con n.° WO 00/56357; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad). Además, éstos pueden producirse usando protocolos de síntesis. Además, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 puede producirse de forma recombinante usando unos procedimientos de ingeniería genética también conocidos por un experto en la técnica (véase el documento de Sau y col. (1997) Microbiology 143:2395 a 2405; y la patente de los Estados Unidos con n.° 6.027.925; cada una de las cuales se

incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad).

[0100] Una cepa de S. aureus que puede usarse para obtener un polisacárido capsular de serotipo 8 aislado es la R2 PFESA0286 de S. aureus. Esta cepa se seleccionó mediante una citometría de flujo con unos anticuerpos de polisacárido de anti-serotipo 8 de conejo después de un cultivo de PFESA0286 de S. aureus (Colección Americana de Cultivos Tipo; Manassas, VA; n.° de Registro de ATCC 49525;) en caldo Frantz modificado. Dos poblaciones, R1 y R2, se observaron durante la citometría de flujo. R1 y R2 se purificaron y volvieron a cultivarse. R2 produjo un polisacárido capsular de serotipo 8. El análisis citométrico de flujo mostró una intensidad de fluorescencia homogénea. En ese sentido, R2 se seleccionó para la producción de polisacárido capsular de serotipo 8.

[0101] Una cepa de S. aureus que puede usarse para obtener un polisacárido capsular de serotipo 5 aislado es PFESA0266 de S. aureus. Esta cepa produce un polisacárido capsular de serotipo 5 durante el crecimiento, y producción alcanza su máximo cuando las células se encuentran en una fase estacionaria. Otras cepas de tipo 5 o tipo 8 de S. aureus pueden usarse para fabricar los polisacáridos respectivos que se obtienen o bien a partir de colecciones de cultivo establecidas o bien muestras clínicas.

[0102] Otro componente del conjugado inmunogénico de la invención es una proteína o molécula portadora con la que se conjuga el polisacárido capsular bacteriano. La expresión "portador de proteína" o "proteína de portador" se refiere a cualquier molécula de proteína que puede conjugarse con un

antígeno (tal como los polisacáridos capsulares) frente a la que se desea una respuesta inmunitaria. La conjugación con un portador puede aumentar la inmunogenicidad del antígeno. La conjugación puede realizarse mediante procedimientos convencionales. Los portadores de proteína preferidos para los antígenos son toxinas, toxoides o cualquier material de reacción cruzada mutante (CRM) de la toxina a partir de tétanos, difteria, tos ferina, Pseudomonas, E. coli, estafilococo y estreptococo. En una realización, un portador particularmente preferido es la CRM_{197} del toxoide diftérico, derivada de cepa C7 de C. diphtheriae (β197), que producen la proteína CRM_{197}. Esta cepa tiene un n.° de registro de ATCC 53281. Un procedimiento para producir la CRM_{197} se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.614.382, que se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. Alternativamente, un fragmento o epítopo del portador de proteína o puede usarse otra proteína inmunogénica. Por ejemplo, un antígeno hapténico puede acoplarse a un epítopo de célula T de una toxina, toxoide o CRM bacterianos. Véase la solicitud de patente de los Estados Unidos con n.° 150.688, presentada el 1 de febrero de 1988, titulada "Synthetic Peptides Representing a T-Cell Epitope as a Carrier Molecule For Conjugate Vaccines"; que se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tal como el toxoide del cólera (por ejemplo, tal como se describe en la solicitud de patente internacional con n.° WO 2004/083251), E. coli LT, E. coli ST, y exotoxina A a partir de Pseudomonas aeruginosa. También pueden usarse proteínas de

la membrana exterior bacteriana tales como el complejo de la membrana exterior c (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de superficie neumocócica A (PspA), proteína de adhesión neumocócica (PsaA) o proteína de Haemophilus influenzae D. También pueden usarse como proteínas portadoras otras proteínas, tal como ovalbúmina, hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado de proteína purificado de la tuberculina (PPD).

[0103] Por consiguiente, en una realización, la proteína de portador dentro del conjugado inmunogénico de la invención es la CRM_{197}, y la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido capsular a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos. En algunas realizaciones, la proteína de portador dentro del conjugado inmunogénico de la invención es la CRM_{197}, y la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido capsular a través de un enlace tioéter. El número de residuos de lisina en la proteína de portador que se han conjugado con un polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 5 a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el polisacárido capsular. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 40 % a un 60 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el polisacárido capsular. En algunas realizaciones, la CRM_{197} comprende de 5

a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el CP8. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP8. En algunas realizaciones, la CRM_{197} comprende de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el CP5. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 40 % a un 60 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP5.

[0104] Tal como se analiza anteriormente, el número de residuos de lisina en la proteína de portador conjugado con el polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas, que puede expresarse como una razón molar. Por ejemplo, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 18:1 a aproximadamente 22:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 15:1 a aproximadamente 25:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 16:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 14:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 12:1; de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 26:1; de aproximadamente 22:1 a aproximadamente 28:1; de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 30:1; de aproximadamente 26:1 a aproximadamente 32:1; de aproximadamente 28:1 a aproximadamente 34:1; de aproximadamente

30:1 a aproximadamente 36:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; o de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 30:1. Así mismo la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 3:1 y 25:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 4:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 17:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 16:1; o de aproximadamente 9:1 a aproximadamente 14:1.

[0105] Otra forma de expresar el número de residuos de lisina en la proteína de portador conjugado con el polisacárido capsular puede ser como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico

de CP8 dado, la CRM_{197} puede comprender de 5 a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Alternativamente, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP8 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre un 110 % y un 50 %. En algunas realizaciones, de un 20 % a un 50 % de lisinas puede tener enlace covalente con el CP8. Aún más alternativamente, de un 30 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197} puede tener enlace covalente con el CP8; de un 10 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 30 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 15 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 15 % de lisinas de CRM_{197}; o de un 10 % a un 12 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP8. Así mismo en un conjugado inmunogénico de CP5 dado, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Alternativamente, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP5 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre un 40 % y un 60 %. En algunas realizaciones, de un 40 % a un 60 % de lisinas puede tener enlace covalente con el CP5. Aún más alternativamente, de un 30 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197} puede tener enlace covalente con el CP5; de un 20 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 50 % a un 70 % de lisinas de CRM_{197}; de un 35 % a un 65 % de lisinas de CRM_{197}; de un 30 % a un 60 %

de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 55 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197}; de un 15 % a un 45 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 40 % a un 70 % de lisinas de CRM_{197}; o de un 45 % a un 75 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP5.

[0106] La frecuencia de unión de la cadena de polisacárido capsular a una lisina en la molécula portadora es otro parámetro para la caracterización de conjugados de polisacáridos de cápsula. Por ejemplo, en una realización, al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar para al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra realización, hay al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido capsular para cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 7 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 9 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 7 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 15 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 6 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 7 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada de 7 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 20 unidades de repetición de sacárido; o cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra

realización, al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido capsular tiene lugar para cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular.

[0107] Una realización de la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende cualquiera de los conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador que se describe anteriormente.

[0108] La expresión "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica con contenido en un antígeno, por ejemplo, un microorganismo o un componente del mismo, composición que puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger a o para tratar un ser humano susceptible de infección por S. aureus, por medio de administración de las composiciones inmunogénicas a través de una vía sistémica, dérmica o mucosa o usarse para generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales que podría usarse para conferir inmunidad pasiva a otro sujeto. Estas administraciones pueden incluir una inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, se usa una administración intranasal para el tratamiento o prevención de estado nasofaríngeo de portador de S. aureus, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana. Pueden usarse también composiciones inmunogénicas para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como

se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0109] Pueden determinarse unas cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular mediante unos estudios convencionales que implican la observación de unas respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

[0110] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir también uno o más de los siguientes antígenos: ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE MntC/SitC/Proteína de unión de saliva, IsdB, IsdA, Opp3a, DltA, HtsA, LtaS, SdrH, SrtA, SpA, SBI, alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína A de unión a fibronectina (fnbA), coagulasa, map, leucocidina Panton-Valentine (pvl), gamma-toxina (hlg), ica, transportador ABC inmunodominante, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, SasF, SasH, EFB (FIB), FnbB, Npase, EBP, sialoproteína II de unión a hueso, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna, TSST-1, mecA, dPNAG, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2 HBP, proteína de unión a vitronectina, HarA, Enterotoxina A, Enterotoxina B, Enterotoxina C1, y autolisina novedosa.

[0111] En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden además al menos uno de un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación por radicales libres, un diluyente o un portador. En una realización, el adyuvante dentro de la composición inmunogénica de la

invención es un adyuvante basado en aluminio. En una realización, el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio que se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, el adyuvante es fosfato de aluminio.

[0112] Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha mostrado que un número de citocinas o linfocinas tienen una actividad de modulación inmunitaria, y por lo tanto pueden ser útiles de una forma igual o similar a adyuvantes, incluyendo, pero sin limitarse a, las interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones-α, β y γ; factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-LCR) (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 5.078.996 y número de Registro de ATCC 39900); factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-LCR); factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-LCR); y los factores de necrosis tumoral α y β. Aún otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento incluyen quimiocinas, incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES; moléculas de adhesión, tal como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas de tipo mucina, por ejemplo, CD34, GlycAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas tal como PECAM, ICAMs, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tal como B7-1, B7-2, CD40 y CD40L;

factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1, y factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas de receptor incluyendo Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6; y caspasas, incluyendo ICE.

[0113] Adyuvantes adecuados que se usan para aumentar una respuesta inmunitaria pueden incluir además, sin limitación, MPL™ (lípido monofosforílico 3-O-desacilado A, Corixa; Hamilton, MT), que se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes, análogos de lípido A de síntesis o compuestos de fosfato de aminoalquilglucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles a través de Corixa, y los que se describen en la patente de los Estados Unidos con n.° 6.113.918. Un AGP de este tipo es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranósido, que se conoce también como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (AF) o como una emulsión estable (SE).

[0114] Aún otros adyuvantes incluyen péptidos de muramilo, tal como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de aceite en agua, tal como MF59 (patente de los Estados Unidos con n.° 6.299.884) (que contiene un 5 % de escualeno, un 0,5 % de

Polysorbate 80, y un 0,5 % de Span 85 (que opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE) que se formulan para dar partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), y SAF (que contiene un 10 % de escualeno, un 0,4 % de Polysorbate 80, un 5 % de polímero L121 bloqueado con Pluronic, y thr-MDP, o bien microfluidizado para dar una emulsión submicrométrica o bien mediante agitación con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande); adyuvante de Freund incompleto (IFA); sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Amphigen; Avridine; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glicósido; polioles de Pluronic; Bordetella inactivada; saponinas, tal como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), que se describen en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.057.540, Iscomatrix® (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.254.339, y complejos inmunoestimulantes (ISCOMS); tuberculosis por Mycobacterium; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos de síntesis tales como oligonucleótidos con contenido en un motivo de CpG (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 6.207.646); CI-31 (Intercell AG, Viena, Austria), que se describe en las patentes EP con n.ºs 1.296.713 y 1.326.634; una toxina de tos ferina (PT) o una mutante de la misma, una toxina de cólera o una mutante de la misma (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o an E. coli heat-labile toxina (LT) o una mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-

R72 (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

[0115] La composición inmunogénica puede comprender opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" quiere decir un portador aprobado por una agencia de regulación de un gobierno estatal, uno Federal, u otra agencia de regulación, o que se enumera en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, incluyendo seres humanos así como mamíferos no humanos. La expresión "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Agua, soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden emplearse como portadores líquidos, en particular para disoluciones inyectables. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. La formulación ha de adecuarse al modo de administración.

[0116] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender además uno o más "inmunomoduladores" adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmunitario, de tal modo que se observa o bien una regulación por aumento o bien una regulación por disminución de inmunidad mediada de forma celular y/o humoral. En una realización, se prevé la regulación por aumento de las armas mediadas de forma celular y/o humoral del sistema inmunitario. Ejemplos de ciertos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citocina, o Iscomatrix® (CSL Limited; Parkville, Australia), que se describe en la patente

de los Estados Unidos con n.° 5.254.339 entre otros. Unos ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden usarse en la composición inmunogénica de la presente invención incluyen el sistema de adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completos y incompletos de Freund, copolímero de Block (CytRx; Atlanta, GA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), Adyuvante Amphigen®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, lípido monofosforílico A, y adyuvante lípido-amina Avridine. Unos ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la composición inmunogénica de la invención incluyen las formulaciones SEAM62 y SEAM 1/2 modificadas. La SEAM62 modificada es una emulsión de aceite en agua con contenido en un 5 % (v/v) de escualeno (Sigma), un 1 % (v/v) de detergente Span® 85 (ICI Surfactants), un 0,7 % (v/v) de detergente de Polysorbate 80 (ICI Surfactants), un 2,5 % (v/v) de etanol, 200 mcg/ml de Quil A, 100 mcg/ml de colesterol, y un 0,5 % (v/v) de lecitina. La SEAM 1/2 modificada es una emulsión de aceite en agua que comprende un 5 % (v/v) de escualeno, un 1 % (v/v) de detergente Span® 85, un 0,7 % (v/v) de detergente de Polysorbate 80, un 2,5 % (v/v) de etanol, 100 mcg/ml de Quil A, y 50 mcg/ml de colesterol. Otros "inmunomoduladores" que pueden incluirse en la composición inmunogénica incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones, u otras citocinas o quimiocinas conocidas otras citocinas o quimiocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como los que

se describen en las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Ha de entenderse que el inmunomodulador y/o adyuvante que va a usarse dependerá del sujeto al que se administrará la composición inmunogénica, la vía de inyección y el número de inyecciones que van a darse.

[0044] Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además uno o más conservantes además de una pluralidad de conjugados de polisacárido capsular estafilocócico-proteína. La FDA requiere que los productos biológicos en viales de múltiples dosis (múltiples dosis) contengan un conservante, con sólo unas pocas excepciones. Los productos de vacuna con contenido en conservantes incluyen vacunas con contenido en cloruro de benzetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabies). Conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparaben, propilparaben, 2-fenoxietanol, cloruro de benzetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato fenilmercúrico.

[0117] Las formulaciones de la invención pueden comprender además uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar, y un antioxidante tal como un eliminador de radicales libres o agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de un componente cualquiera, por ejemplo, un agente de quelación, puede determinar si es deseable otro componente (por ejemplo, un eliminador) o no. La composición final que se formula para la

administración ha de ser estéril y/o libre de pirógenos. El experto puede determinar de forma empírica qué combinaciones de estos y otros componentes serán óptimas para la inclusión en las composiciones inmunogénicas con contenido en conservante de la invención, dependiendo de una variedad de factores tales como las condiciones de almacenamiento y de administración particulares que se requieren.

[0118] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones fisiológiamente aceptables que se seleccionan de, pero sin limitarse a, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En ciertas realizaciones, la formulación está tamponada a dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

[0119] En ciertas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición inmunogénica o formulación de la invención. El pH de una formulación de la invención puede ajustarse usando técnicas convencionales en la técnica. El pH de la formulación puede ajustarse para ser de entre 3,0 y 8,0. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede ajustarse para ser, entre 3,0 y 6,0, 4,0 y 6,0, o 5,0 y 8,0. En otras realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede ajustarse para ser, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, o aproximadamente 8,0. En ciertas realizaciones, el pH puede ser, o puede ajustarse para ser, en un

intervalo de 4,5 a 7,5, o de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2, de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,5, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 o de 7,5 a 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,8.

[0120] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluyendo pero sin limitarse a, MgCl2, CaCl2 y MnCl2, a una concentración variando de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, prefiriéndose con hasta aproximadamente 5 mM.

[0121] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, incluyendo pero sin limitarse a, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, y sulfato de potasio, presentes a una fuerza iónica que es fisiológiamente aceptable por el sujeto tras la administración parenteral e incluidas a una concentración final para producir una fuerza iónica u osmolaridad seleccionadas en la formulación final. La fuerza iónica u osmolalidad finales de la formulación se determinará por múltiples componentes (por ejemplo, iones de compuesto(s) de tamponamiento y otras sales de no tamponamiento. Una sal preferida, NaCl, está presente desde un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, seleccionándose las concentraciones de sal para complementar otros componentes (por ejemplo, azúcares) de tal modo que la osmolaridad total final de la formulación es compatible con la administración parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea) y promoverá la estabilidad a largo plazo de los

componentes inmunogénicos de la formulación de composición inmunogénica a lo largo de varios intervalos de temperatura. Formulaciones libres de sal tolerarán intervalos aumentados del uno o más crioprotectores seleccionados para mantener los niveles de osmolaridad finales deseados.

[0122] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores que se seleccionan de, pero sin limitarse a, disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) y polihidroxi-hidrocarburos (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

[0123] En ciertas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 200 mOs/L a aproximadamente 800 mOs/L, con un intervalo preferido de aproximadamente 250 mOs/L a aproximadamente 500 mOs/L, o aproximadamente 300 mOs/L a aproximadamente 400 mOs/L. Una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 25 % de sacarosa, y preferentemente de aproximadamente un 7 % a aproximadamente un 15 %, o aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 12 % de sacarosa. Alternativamente, una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 12 % de sorbitol, y preferentemente de aproximadamente un 4 % a un 7 %, o aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 6 % de sorbitol. Si se añade una sal tal como cloruro de sodio, entonces el intervalo eficaz de sacarosa o sorbitol se reduce relativamente. Estas y otras consideraciones tales como la osmolalidad y la osmolaridad se conocen bien en la técnica.

[0124] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres y/o agentes quelantes. Una variedad de eliminadores de radicales libres y agentes de quelación se conocen en la técnica y se aplican a las formulaciones y los procedimientos de uso que se describen en el presente documento. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA, y varias combinaciones de dos o más de los anteriores. En ciertas realizaciones, al menos puede añadirse un eliminador de radicales libres no reductor a una concentración que aumenta eficazmente la estabilidad a largo plazo de la formulación. También puede añadirse uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres/agentes de quelación en varias combinaciones, tal como un eliminador y un catión divalente. La elección de agente de quelación determinará si es necesaria o no la adición de un eliminador.

[0125] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos iónicos, incluyendo pero sin limitarse a, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitano, Polysorbate-80 (Tween 80), Polysorbate-60 (Tween 60), Polysorbate-40 (Tween 40) y Polysorbate-20 (Tween 20), polioxietileno-alquil éteres, incluyendo pero sin limitarse a, Brij 58, Brij 35, así como otros tales como Triton X-100; Triton X- 114, NP40, Span 85 y la serie de tensioactivos no iónicos de Pluronic (por ejemplo, Pluronic 121), con

componentes preferidos Polysorbate-80 a una concentración de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,25 %) o Polysorbate-40 a una concentración de aproximadamente de un 0,001 % a un 1 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,5 %).

[0126] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes de estabilización adicionales adecuados para su administración parenteral, por ejemplo, un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ejemplo, cisteína, N-acetilcisteína, glutatión reducido, tioglicolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol, o mezclas de los mismos). Alternativa u opcionalmente, las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden estabilizarse adicionalmente eliminando el oxígeno de los recipientes de almacenamiento, protegiendo a la formulación de la luz (por ejemplo, usando recipientes de vidrio de color ámbar).

[0127] Las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden comprender uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que incluye cualquier excipiente que no induce por sí mismo una respuesta inmunitaria. Los excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col, 2001, Vaccine, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales portadores son bien conocidos por el experto. Excipientes farmacéuticamente aceptables se analizan, por

ejemplo, en Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN:0683306472.

[0128] Las composiciones de la invención pueden estar liofilizadas o en forma acuosa, es decir disoluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas pueden administrarse de forma ventajosa directamente a partir de su forma envasada y son por lo tanto ideales para inyección sin la necesidad de reconstitución en medio acuoso tal como se requiere de otro modo para composiciones liofilizadas de la invención.

[0129] La administración directa de composiciones inmunogénicas de la presente invención a un sujeto puede llevarse a cabo mediante la administración parenteral (por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intravenosa, o en el espacio intersticial de un tejido); o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. En una realización preferida, la administración parenteral es mediante inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o el brazo del sujeto. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección libre de aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. Las composiciones de la invención pueden prepararse en varias formas, por ejemplo, para inyección o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones. En ciertas realizaciones, la composición puede prepararse como un polvo o pulverización para su administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición puede prepararse como un supositorio u óvulo vaginal, o para su administración

nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como una pulverización, gotas, gel o polvo.

[0130] La cantidad de conjugado en cada dosis de composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Tal cantidad puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 µg, y más en particular de 1 a 5 µg.

[0131] Pueden determinarse unas cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular mediante unos estudios convencionales que implican la observación de unas respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

Acondicionamiento y formas farmacéuticas

[0132] Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden envasarse forma de dosis unitaria o múltiples dosis (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis, o más). Para formas de múltiples dosis, habitualmente pero no necesariamente se prefieren los viales con respecto a las jeringuilla previamente cargadas. Los formatos de múltiples dosis adecuados incluyen pero no se limitan a: de 2 a 10 dosis por recipiente a 0,1 a 2 ml por dosis. En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO2007/127668, que se incorpora por referencia en el presente documento.

Las composiciones pueden presentarse en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o pueden presentarse en dispositivos de administración cargados previamente, por ejemplo, jeringuillas de un solo componente o múltiples componentes, que pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringuilla habitualmente, pero no necesariamente, contiene una dosis individual de la composición inmunogénica con contenido en conservante de la invención, a pesar de que también se prevén jeringuillas de múltiples dosis, cargadas previamente. De forma similar, un vial puede incluir una dosis individual pero alternativamente puede incluir múltiples dosis.

[0133] Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano adulto, joven, adolescente, niño o lactante (es decir, no más de un año de edad) y en realizaciones preferidas puede administrarse mediante inyección.

[0134] Las composiciones inmunogénicas líquidas de la invención son también adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando una composición inmunogénica va a usarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringuillas cargadas preparadas, o uno o más de cada, usándose el contenido de la jeringuilla para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección, o viceversa.

[0135] Alternativamente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden liofilizarse y reconstituirse, por ejemplo, usando uno de una multitud de procedimientos para la liofilización que se conocen bien en la técnica para formar partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esférica), tal como microgránulos o esferas, que tienen características de partícula tales como tamaños de diámetro medio que pueden seleccionarse y controlarse variando los procedimientos exactos que se usan para prepararlos. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender además un adyuvante que puede prepararse opcionalmente con o estar contenido en partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esféricas) separadas tales como microgránulos o esferas. En tales realizaciones, la presente invención proporciona además un kit de composición inmunogénica que comprende un primer componente que incluye una composición inmunogénica seca, estabilizada, que comprende además opcionalmente uno o más conservantes de la invención, y un segundo componente que comprende una disolución acuosa, estéril, para la reconstitución del primer componente. En ciertas realizaciones, la disolución acuosa comprende uno o más conservantes, y puede comprender opcionalmente al menos un adyuvante (véase, por ejemplo, el documento WO2009/109550 (que se incorpora en el presente documento por referencia).

[0136] Aún en otra realización, un recipiente del formato de múltiples dosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, artículos de vidrio de laboratorio generales, matraces, vasos de precipitados, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, jarras, viales, cierres para viales (por ejemplo, un tapón de caucho, un

tornillo en la tapa), ampollas, jeringuillas, jeringuillas de doble cámara o de múltiples cámaras, tapones de jeringuilla, émbolos de jeringuillas, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El recipiente de la presente invención no está limitado en cuanto al material de fabricación, e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una realización particular, el recipiente del formato es un vial de vidrio Schott tipo 1 de 5 ml con un tapón de butilo. El experto apreciará que el formato expuesto anteriormente no es de ningún modo una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como guía para el experto con respecto a la variedad de formatos disponibles para la presente invención. Formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención pueden encontrarse en catálogos publicados de vendedores y fabricantes de equipos de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Procedimientos para fabricar conjugados inmunogénicos

[0137] La presente invención también incluye procedimientos de fabricación de los conjugados inmunogénicos que se describen en el presente documento. Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol), CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida).

[0138] Por consiguiente, una realización de la invención proporciona un procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) combinar un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con imidazol o triazol para producir un polisacárido combinado; b) hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT en un disolvente orgánico y aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 % p/v de agua para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado; c) purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado; d) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado con una proteína de portador en el disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador; y e) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador. En una realización, antes de la etapa (d), el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado se combina con una proteína de portador.

[0139] En una realización de la invención, se prevé otro procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a)

101

combinar un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con imidazol o triazol para producir un polisacárido combinado; b) hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT en un disolvente orgánico y aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 % p/v de agua para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado; c) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado con una proteína de portador en el disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador; y d) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador.

[0140] En una realización, el disolvente orgánico dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico es un disolvente aprótico polar. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar que se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA). En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

[0141] En una realización, la etapa de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende proporcionar aproximadamente un exceso molar de 20 veces de CDT en comparación con el polisacárido.

En una realización, la etapa de purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende una diafiltración.

[0142] En una realización, la proteína de portador dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico es la CRM_{197}. En una realización, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación de un conjugado inmunogénico se hace que reaccione con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

[0143] En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende la dilución en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C. En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende la dilución en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

[0144] En una realización, se purifica el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que se produce de acuerdo con los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico. En una realización, la purificación del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende una diafiltración.

[0145] En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico, el polisacárido combinado de serotipo 5 u 8 se liofiliza y resuspende. En una realización, tanto el polisacárido combinado como la proteína de portador son por separado liofilizado y se resuspenden antes de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT. En una realización, el polisacárido combinado liofilizado y/o la proteína de portador liofilizada se resuspenden en un disolvente orgánico. En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

[0146] En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado combinado con una proteína de portador dentro del procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado y la proteína de portador se liofilizan por separado y se resuspenden. En una realización, la proteína de portador es la CRM_{197} y antes de la liofilización la CRM_{197} se somete a diafiltración frente a NaCl. En una realización, antes de la liofilización la CRM_{197} se somete a diafiltración frente a NaCl y la razón en p/p de NaCl/CRM se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5.

[0147] Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento de fabricación basado en PDPH de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con PDPH y una carbodiimida en un

disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH; b) hacer que reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado; c) purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado; d) hacer que reaccione una proteína de portador con un ácido bromoacético en un disolvente orgánico para producir una proteína de portador activada; e) purificar la proteína de portador activada para producir una proteína de portador activada purificada; f) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado con la proteína de portador activada purificada para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador; y g) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador.

[0148] En una realización, el ácido bromoacético que se usa dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es un éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS). En una realización, la proteína de portador que se usa dentro de los procedimientos basados en PDPH de la invención es la CRM_{197} y el BAANS se añade en una razón en peso de CRM_{197}:BAANS de aproximadamente 1:0,1 a aproximadamente 1:0,5.

[0149] En una realización, el disolvente orgánico dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es un disolvente aprótico polar. En una realización, el

disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar que se selecciona del grupo que consiste en DMSO, DMF, dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y HMPA. En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

En una realización, la carbodiimida que se usa dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC). En una realización, la etapa de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 con PDPH y EDAC en un disolvente orgánico comprende mantener una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de aproximadamente 1:5:3.

[0150] En una realización, el agente reductor que se usa dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es ditiotreitol (DTT).

[0151] En una realización, cada una de las etapas de purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado y purificar la proteína de portador dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico comprende diafiltración.

[0152] En una realización, la proteína de portador dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es la CRM_{197}. En una realización, el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación de un conjugado inmunogénico se hace que reaccione con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

[0153] En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar dentro de los procedimientos de fabricación

basados en PDPH de un conjugado inmunogénico comprende la adición de clorhidrato de cisteamina.

[0154] En una realización, se purifica el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que se produce de acuerdo con los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico. En una realización, la purificación del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende una diafiltración.

[0155] En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado con la proteína de portador activada purificada dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico, tanto el polisacárido activado purificado como la proteína de portador activada purificada se liofilizan por separado y se resuspenden. En una realización, el polisacárido activado liofilizado y/o la proteína de portador activada liofilizada se resuspenden en un disolvente orgánico. En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

[0156] Tal como se usa en el presente documento, "liofilización" quiere decir un procedimiento de deshidratación el que el polisacárido capsular bacteriano se congela mientras que se reduce la presión del entorno en presencia de suficiente calor para permitir que el agua congelada sublime directamente a partir de una fase sólida hasta una fase gaseosa. Puede usarse procedimiento conocido en la técnica para liofilizar polisacáridos. Véase, por ejemplo, Harris & Angal (1989) "Protein Purification Methods", en: Kennedy & Cabral, eds. "Recovery Procedimientos for Biological Materials" (John Wiley & Sons; 1993); la patente de los Estados Unidos con n.°

4.134.214; y la publicación de solicitud de patente internacional con n.° WO 2003/086471; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. Opcionalmente, puede incluirse un crioprotector durante la liofilización, tal como, por ejemplo, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, arabinosa, xilosa, galactosa, sorbitol o manitol.

[0157] Tal como se usa en el presente documento, "activar" y "activación" quiere decir que un polisacárido capsular bacteriano o proteína de portador se modifica de tal modo que se vuelve sensible a conjugación (es decir, al menos un resto debe hacerse capaz de unirse covalentemente a la molécula portadora). Por ejemplo, con respecto a Procedimientos de conjugación basados en CDT de la presente invención, el polisacárido se activa en un entorno de baja humedad (por ejemplo, en DMSO) para formar restos de carbamato de triazol con restos adiltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. Los polisacáridos activados pueden hacerse reaccionar a continuación con la proteína CRM_{197}, lo que conduce al desplazamiento nucleofílico del triazol mediante residuos de lisina dentro de CRM_{197} y formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Por el contrario, con respecto a los procedimientos de conjugación basados en PDPH de la presente invención, tanto las proteínas portadoras como los polisacáridos se activan antes de la conjugación: 1) la activación de CRM_{197} implica introducir grupos bromoacetilo en la proteína CRM_{197} mediante reacción de grupos amina con el éster de N-hidroxisuccimida de ácido bromoacético; y 2) la activación de polisacárido implica acoplar la carbodiimida-grupos carboxilato activados de

Ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido con el grupo hidrazida del ligador heterobifuncional de hidrazida reactiva-sulfhidrilo PDPH, seguido por la reducción con DTT. Los polisacáridos activados pueden hacerse reaccionar a continuación con la proteína de portador activada de tal modo que los tioles de PDPH-polisacáridos tiolados reaccionan con grupos bromoacetilo de proteína de portador activada dando como resultado un enlace covalente de tioéter formado por desplazamiento de bromuro.

[0158] De acuerdo con los procedimientos de la invención, pueden purificarse los polisacáridos capsulares, proteínas portadoras, y/o conjugados de polisacárido-proteína. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para purificar polisacáridos o proteínas, tal como concentración/diafiltración, precipitation/elución, cromatografía en columna y filtración profunda. Véase, por ejemplo, Farrés y col. (1996) Biotechnol. Tech. 10:375 a 380; Gonçalves y col. en: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (Antonio Mendez Vilas, ed. 1ª ed. Badajoz, España: Formatex; 2007. págs. 450 a 457); Tanizaki y col. (1996) J. Microbiol. Methods 27:19 a 23; y la patente de los Estados Unidos con n.° 6.146.902; y la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos con n.° 2008/0286838; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad.

[0159] Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aislado" o "purificado" quiere decir que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de manera natural o de su organismo huésped si éste es una entidad recombinante, o se lleva de un

entorno a un entorno diferente). Por ejemplo, un polisacárido aislado, péptido o proteína está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes en la célula o fuente de tejido de la que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente o está presente de otro modo en una mezcla como parte de una reacción química. En la presente invención, la proteína o polisacárido puede aislarse a partir de la célula bacteriana o a partir del residuo celular, de tal modo que se proporcionan en una forma útil en la fabricación de una composición inmunogénica. La expresión "aislado" o "aislar" puede incluir purificar, o purificación, incluyendo por ejemplo, los procedimientos de purificación de los polisacáridos capsulares, tal como se describe en el presente documento. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polisacárido/polipéptido/proteína en las que el polisacárido/polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un polipéptido/proteina, polisacárido, o conjugado que está sustancialmente libre de material celular u otros compuestos incluye preparaciones del polipéptido/proteína, polisacárido, o conjugado que tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 2,5 % o un 1 % (en peso seco) de proteína, polisacárido, u otros compuestos contaminantes. Cuando el polipéptido/proteina se produce de forma recombinante, está también preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, o un 1

% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el polipéptido/proteína o polisacárido se produce mediante síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína o polisacárido. Por consiguiente, tales preparaciones del polipéptido/proteína o polisacárido tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, o un 1 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del fragmento de polipéptido/proteína o polisacárido de interés.

[0160] Los conjugados inmunogénicos que se producen mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento pueden almacenarse en agua o en un tampón de pH neutro de baja fuerza iónica o liofilizarse en un polvo seco.

Procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria y proteger frente a infección por S. Aureus

[0161] La presente invención también incluye procedimientos de uso para composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Por ejemplo, una realización de la invención proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria frente a S. aureus que comprende la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Una realización de la invención proporciona un procedimiento de protección de un sujeto frente a una infección con S. aureus, o un procedimiento de prevención de infección con S. aureus, o un procedimiento

100

de reducción de la gravedad de o retardo de la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por S. aureus, comprendiendo los procedimientos la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Una realización de la invención proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma terapéutica o profiláctica de una composición inmunogénica que se describe en el presente documento al sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento de tratamiento o prevención de una infección, enfermedad o afecciones por estafilococos comprende tratamiento en seres humanos, veterinaria, en animales o en la agricultura. Otra realización proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de la composición inmunogénica que se describe en el presente documento, y usando dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Una realización de la invención proporciona un procedimiento de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma profiláctica de una

composición inmunogénica que se describe en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

[0162] Una "respuesta inmunitaria" frente a un antígeno o composición inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células frente a moléculas presentes en el antígeno o composición de vacuna de interés. Para los fines de la presente invención, 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 por el antígeno en la composición inmunogénica de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria mediada por células" es una respuesta mediada por células T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" se provoca mediante la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas de clase I o de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), CD1 u otras moléculas similares al CMH no clásicas. Ésta activa células T CD4+ cooperadoras específicas de antígeno o linfocitos T citotóxicos CD8+ ("CTL"). Los CTL tienen espeficificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por CMH clásicos y no clásicos y se expresan sobre las superficies de células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante las células T cooperadoras. Las células T cooperadoras actúan para ayudar a estimular la función, y enfocan la actividad de, células efectoras no específicas frente a células que presentan

péptido u otros antígenos en asociación con moléculas clásicas o no clásicas de CMH en su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo que se producen mediante células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluyendo las derivadas de células T CD4+ y CD8+. La capacidad de una composición o antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante un número de ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, sometiendo a ensayo linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medición de la producción de citocinas por células T en respuesta a la reestimulación con antígeno. Tales ensayos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col. (1993) J. Immunol. 151:4189 a 4199; y Doe y col. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369 a 2376.

[0163] Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") quiere decir uno o más cualquiera de lo siguiente: (i) la prevención de infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la gravedad de, o, en la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de infección) o terapéuticamente (tras la infección). En la presente invención, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunizar de forma profiláctica y/o terapéutica, un huésped

animal frente a una infección microbiana (por ejemplo, una bacteria tal como estafilococo). Los procedimientos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los procedimientos de la presente invención pueden también ponerse en práctica en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

[0164] Tal como se usa en el presente documento, "mamífero" quiere decir un ser humano o animal distinto de ser humano. Más en particular, mamífero se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportivos y mascotas de compañía tales como una mascota doméstica y otro animal domesticado incluyendo, pero sin limitarse a, ganado bovino, ovejas, hurones, cerdos, caballos, conejos, cabras, perros, gatos, y similares. Los animales de compañía preferidos son perros y gatos. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

[0165] Una "cantidad inmunogénica", y "cantidad inmunológicamente eficaz", usándose ambas de forma intercambiable en el presente documento, se refiere a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, o bien una respuesta celular (célula T) o bien humoral (células B o anticuerpo), o ambas, tal como se mide por ensayos convencionales conocidos por un experto en la técnica.

[0166] Las cantidades de un conjugado particular en una composición se calculan en general en base al polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado de CP5 con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido CP5 conjugado y aproximadamente 20 mcg de polisacárido CP5 no conjugado en

una dosis de polisacárido CP5 de 100 mcg. La contribución de la proteína al conjugado no se considera normalmente cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 mcg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg, y más en particular de 1 a 10 mcg. La "cantidad inmunogénica" de los componentes de polisacárido diferentes en la composición inmunogénica, puede divergir y cada uno puede comprender 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, o aproximadamente 100 mcg de cualquier antígeno de polisacárido particular.

[0167] "Enfermedad invasiva" por S. aureus es el aislamiento de bacterias a partir de un sitio normalmente estéril, en el que están asociados signos/síntomas clínicos de enfermedad. Los sitios del organismo normalmente estériles incluyen sangre, LCR, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido articular/sinovial, hueso, sitio interno del organismo (ganglio linfático, cerebro, corazón, hígado, bazo, fluido vítreo, riñón, páncreas, ovario) u otros sitios normalmente estériles. Las afecciones clínicas que caracterizan a las enfermedades invasivas incluyen bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, choque septicémico y más.

[0168] La eficacia de un antígeno como un inmunógeno, puede medirse o bien mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de una célula T para lisar su célula diana específica, o bien midiendo los niveles de actividad de células B midiendo los niveles de anticuerpos en circulación

específicos para el antígeno en el suero. Una respuesta inmunitaria puede detectarse también midiendo los niveles en suero de anticuerpo específico de antígeno que se induce a continuación de la administración del antígeno, y más específicamente, midiendo la capacidad de los anticuerpos que se inducen de tal forma para aumentar la capacidad opsonofagocítica de glóbulos blancos particulares, tal como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria puede medirse exponiendo el huésped inmunizado al antígeno que se ha administrado. Por ejemplo, si el antígeno con respecto al que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección que se induce mediante la cantidad inmunogénica del antígeno se mide detectando el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de una exposición de los animales a las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección puede medirse midiendo al menos un síntoma asociado con la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada con la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna o en las composiciones inmunogénicas multiantígeno o multicomponente variará con respecto a cada uno de los otros componentes y puede determinarse mediante procedimientos conocidos por el experto. Tales procedimientos incluirían unos procedimientos para medir la inmunogenicidad y/ o la eficacia en vivo. En ciertas realizaciones, la expresión "aproximadamente" quiere decir dentro de un 20 %, preferentemente dentro de un 10 %, y más preferentemente dentro de un 5 %.

[0169] La invención proporciona además anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a los conjugados

inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de la presente invención. En algunas realizaciones, los anticuerpos se generan después de la administración a un sujeto de los conjugados inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de la presente invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona unos anticuerpos purificados o aislados que se dirigen contra uno o más de los conjugados inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de la presente invención. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente invención proporciona además unas moléculas de polinucleótido que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y una célula, línea celular (tal como células de hibridoma u otras líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para la producción recombinante de anticuerpos) o un animal transgénico que produce un anticuerpo o una composición de anticuerpo de la invención, usando unas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

[0170] Los anticuerpos o composiciones de anticuerpos de la invención pueden usarse en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales, y el uso de dicho anticuerpo o composición de anticuerpo para conferir

inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles también para procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, detectar la presencia o cuantificar los niveles de CP5, de CP8 o de un conjugado de los mismos.

[0171] Varios modelos animales que se conocen en la técnica pueden usarse para evaluar la eficacia de una cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Por ejemplo:

[0172] Modelo murino de septicemia pasivo: Se inmunizan unos ratones de forma pasiva por vía intraperitoneal (i.p.) con IgG inmunitario o anticuerpo monoclonal. Los ratones se exponen 24 horas más tarde a una dosis letal de S. aureus. La exposición bacteriana se administra por vía intravenosa (i.v. o i.p.) lo que asegura que cualquier supervivencia puede atribuirse a la interacción en vivo específica del anticuerpo con las bacterias. Se determina que la dosis de exposición bacteriana es la dosis que se requiere para conseguir una septicemia letal de aproximadamente un 20 % de los ratones de control no inmunizados. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede llevarse a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

[0173] Inmunización activa y modelo de exposición: En este modelo, se inmunizan unos ratones de forma activa por vía subcutánea (SC) con un antígeno diana a 0, 3 y 6 semanas (o un programa similar conocido por los expertos en la técnica) y se exponen a S. aureus en la semana 8 (o otro programa similar conocido por los expertos en la técnica) por la vía intravenosa o intraperitoneal. La dosis de exposición bacteriana se calibra para obtener aproximadamente un 20 % supervivencia en el grupo de control a lo largo de un periodo de 14 días. La evaluación estadística de los estudios

de supervivencia puede llevarse a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

[0174] Modelo de endocarditis infecciosa pasiva: Un modelo de inmunización pasiva para endocarditis infecciosa (IE) causada por S. aureus se ha usado anteriormente para mostrar que el ClfA puede inducir una inmunidad protectora. Véase el documento de Vernachio y col. (2006) Antmicro. Agents & Chemo. 50:511 a 518. En este modelo de IE, se usan conejos o ratas para simular unas infecciones clínicas que incluyen un catéter venoso central, bacteriemia, y siembra hematógena a órganos distales. A unos conejos o ratas cateterizados con vegetaciones de válvula aórtica estériles se les administra una única inyección intravenosa de un anticuerpo monoclonal o policlonal especifico para el antígeno diana. Después de 24 horas, los animales se exponen por vía i.v. a una cepa de MRSA o a cepas estafilocócicas heterólogas. A continuación, 48 horas después de una exposición, las vegetaciones cardíacas, los riñones y la sangre se recolectan y se cultivan. La frecuencia de infección por estafilococos en las vegetaciones de válvula cardíaca, los riñones y la sangre se mide a continuación. En un estudio, cuando los animales se expusieron a o bien MRSE ATCC 35984 o bien MRSA PFESA0003, se mostraron unas reducciones significativas en la velocidad de infección usando o bien la preparación de anticuerpos policlonales o bien la de anticuerpos monoclonales to ClfA. Véase el documento de Vernachio y col., citado anteriormente.

[0175] Modelo de endocarditis infecciosa pasiva: El modelo de endocarditis infecciosa se ha adaptado también para los estudios de inmunización activa.

Se inmunizan conejos o ratas por vía intramuscular (IM) con un antígeno diana y se exponen a S. aureus dos semanas más tarde a través de la vía i.v..

[0176] Modelo de pielonefritis: En el modelo de pielonefritis, se inmunizan ratones en las semanas 0, 3 y 6 (o un programa similar conocido por los expertos en la técnica) con los antígenos diana. En la semana 8, los animales se exponen mediante, por ejemplo, una inyección por vía i.p. de, por ejemplo, 1,7 x 10^8 ufc PFESA0266 de S. aureus. Después de 48 horas, los riñones y/o otros tejidos se recolectan y se cultivan. Por último, se recuentan las unidades de formación de colonias de exposición bacterias en los riñones y/o en otros tejidos. Este modelo evalúa la diseminación sistémica en el animal.

Supervisión de anticuerpos funcionales usando ensayos de destrucción opsonofagocíticas

[0177] Las células efectoras diferenciadas a partir de una línea celular (por ejemplo, HL60) o células polimorfonucleares (PMN) aisladas de sangre de donante humano usando una disolución LYMPHOLYTE®-poli (Cedarlane laboratories limited, Ontario, Canadá), de acuerdo con el protocolo del fabricante, pueden usarse para este ensayo. Las células efectoras volvieron a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado con contenido en un 1 % de albúmina de suero bovino) a una concentración de aproximadamente 2 X 10^7 células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que estuvieron listas para su uso. Se hizo que la cepa de S. aureus PFESA0266 creciera durante la noche sobre unas placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y

volvieron a suspenderse en tampón de ensayo con un contenido de un 5 % de glicerol a una DO 600 = 1, lo que es igual a una concentración de aproximadamente 5 X 10^8 ufc/ml. Unas alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana se congelaron y se almacenaron a -40 °C hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de 106 ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando unas placas de polipropileno de 1 ml 96 de Deep-Well estériles. Unas diluciones en serie en dos veces de muestras de anticuerpo (50 µl) se prepararon, a lo que siguió la adición de 300 µl de tampón de ensayo a la mezcla de anticuerpos. Se añadieron bacterias (50 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos. La etapa de opsonización fue seguida por la adición de 50 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, se añadieron 50 µl de células efectoras (107 células/ml concentración) a la placa y la suspensión se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Una alícuota de 50 µl de la suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, mediante agitación con vórtex para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1 hora con un mezclado continuo usando un agitador de tipo bandeja giratoria. Al final de la incubación, una alícuota de 50 µl de suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtice para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la razón del número de ufc que

sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células efectoras con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células efectoras. Los controles con contenido en bacterias, complemento, y sueros se incluyeron para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la aglutinación.

Adsorción de complemento

[0178] El suero a partir de donantes humanos adsorbido frente a cepas de S. aureus PFESA0266, PFESA0286 y PFESA0270 puede usarse como una fuente de complemento en el ensayo. Se hizo que crecieran unas cepas de S. aureus durante la noche sobre placas de TSA a 37 °C. Las células se rasparon de la placa y volvieron a suspenderse en PBS estéril. Las células bacterianas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sedimento celular volvió a suspenderse en suero humano para su adsorción. El suero se incubó con bacterias en un Nutator a 4 °C durante 30 minutos. Las células se centrifugaron, el suero se transfirió a otro tubo con contenido en bacterias y la etapa de adsorción se repitió de nuevo durante 30 minutos. Por último, las células se centrifugaron y el suero se pasó a través de un filtro de 0,2 micrómetros antes de que 0,5 ml de alícuotas se congelaran en nitrógeno líquido.

Procedimiento II - OPA usando células HL-60

[0179] Las células HL-60 se diferenciaron de acuerdo con S. Romero-Steiner, y col., Clin Diagn Lab Immunol 4 (4) (1997), págs. 415 a 422. Las células HL-60 recolectadas volvieron a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado con contenido en un 1 % de albúmina de suero

bovino) a aproximadamente 108 células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que estuvieron listas para su uso. Se hizo que S. aureus creciera durante la noche sobre unas placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y volvieron a suspenderse en tampón de ensayo con un contenido de un 5 % de glicerol a una DO 600 = 1, lo que es igual a aproximadamente 5 X 10^8 ufc/ml. Unas alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana se congelaron y se almacenaron a -40 °C hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de 106 ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando unas placas de polipropileno de 1 ml 96 de Deep-Well estériles. Se prepararon unas diluciones en serie en dos veces de muestras de anticuerpo monoclonal (25 µl), a lo que siguió la adición de 150 µl de tampón de ensayo a la suspensión de anticuerpos. Se añadieron bacterias (25 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos seguido por la adición de 25 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, 25 µl de células HL-60 (107 células/ml) se añadieron a la placa y la suspensión se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Una alícuota de 25 µl de la suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtice para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1 hora con un mezclado continuo usando un agitador de tipo bandeja giratoria. Al final de la incubación, una alícuota de 25 µl de suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de

saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtice y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la razón del número de ufc que sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células HL-60. Los controles con contenido en bacterias, complemento y AcM se incluyeron para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la aglutinación.

[0180] Los siguientes ejemplos se prevén a modo de ilustración, no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus.

[0181] En el presente ejemplo, se describe la producción de varios intervalos de tamaño de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus. La estructura de la unidad de repetición de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus se muestra en la figura 1. Los procedimientos que se describen en el presente documento son eficaces para producir polisacárido capsular de serotipo 8 con pesos moleculares que varían de aproximadamente 20 kDa a 700 kDa. Mediante una selección apropiada de las condiciones, pueden aislarse y purificarse polisacáridos capsulares de serotipo 8 de alto peso molecular variando de 50 kDa a 700 kDa en peso molecular. Para su uso en composiciones inmunogénicas, el polisacárido capsular de serotipo 8 puede aislarse y purificarse variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular y muchos intervalos deseados. En base a las características de crecimiento y

a la cantidad de cápsula que se produce, se usaron unas cepas PFESA0005 o PFESA0286 para la producción de polisacárido capsular de serotipo 8. Las cápsulas aisladas a partir de las cepas PFESA0005 o PFESA0286 mostraron que eran idénticas.

[0182] Para la producción de polisacáridos capsulares de serotipo 8, se hizo que las cepas crecieran en un medio complejo que consistía principalmente en una fuente de carbono (o bien lactosa o bien sacarosa), harina de soja hidrolizada como la fuente de nitrógeno, y trazas de metales. Se hizo que las cepas crecieran en biorreactores durante de 2 a 5 días.

[0183] Antes del procesado en autoclave, una muestra se retiró para someter a prueba el nivel de la Enterotoxina estafilocócica B (SEB) en el cultivo. En presencia de un 0,05 % de Polysorbate 80, la concentración de SEB en la fermentación fue de 15 a 20 ng/ml. Experimentos previos mostraron que el procesado en autoclave del cultivo durante 1 hora redujo el nivel de SEB a menos de 0,1 ng/ml, que se encuentra por debajo del límite de detección para el kit TECRA.

[0184] Un polisacárido fraccionado en etanol, diafiltrado, se cargó en una columna Q-Sepharose AEC y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl tal como se describe anteriormente. Las fracciones se analizaron mediante el ensayo de O-Acetilo y una prueba de doble inmunodifusión para determinar la presencia de polisacárido de serotipo 5 y un ensayo de fosfato para determinar la presencia de ácido teicoico (TA). La presencia de polisacárido de serotipo 8 se detectó en las fracciones 35 a 95 (las figuras 2A y B).

[0185] Para reducir la contaminación con ácido teicoico, las fracciones 35 a 75 se agruparon y cualquier ácido teicoico residual se oxidó con

metaperyodato de sodio para permitir su eliminación mediante diafiltración de 3K frente a diH2O.

[0186] La purificación de polisacárido capsular de serotipo 8 que se usa para la preparación de conjugados se realizó mediante dos procedimientos diferentes que se basan en una temperatura elevada y en un pH bajo para afectar a la liberación de cápsula a partir de la célula y reducir el peso molecular del polisacárido. El peso molecular resultante dependía del momento, la temperatura y el pH de la etapa de hidrólisis.

[0187] La caracterización del polisacárido capsular de serotipo 8 se realizó usando las técnicas que se especifican en la tabla 1.

Tabla 1: Ensayos de caracterización para polisacáridos capsulares de serotipo 8 de S. aureus purificados.

Especificidad	Ensayo
Proteína residual	ensayo colorimétrico de Lowry
Ácidos nucleicos residuales	barrido de 260nm
Ácido teicoico residual	ensayo colorimétrico de fosfato
Peptidoglicano residual	HPAEC-PAD
Tamaño	SEC-MALLS
Composición	HPAEC-PAD
Identidad	1H-RMN o reacción con AcM específico
O-acetilación	1H-RMN
Concentración	MALLS-RI o HPAEC-PAD

[0188] Los polisacáridos de cápsula que se producen mediante los procedimientos que se describen a continuación dan como resultado unos

polisacáridos puros bien caracterizados con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico, peptidoglicano y ácido teicoico.

[0189] En el primer procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, la preparación se trató con un cóctel de enzimas (por ejemplo, ribonucleasa, desoxiribonucleasa, lisozima y proteasa) para digerir impurezas. Después de la incubación, las impurezas residuales se precipitan mediante la adición de etanol (concentración final de aproximadamente un 25 %). Después de la eliminación del etanol residual, una disolución con contenido en un polisacárido de cápsula se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y se eluyó con un gradiente de sal lineal. Las fracciones con contenido en polisacárido de cápsula se agruparon y se trataron con metaperyodato de sodio. Este tratamiento dio como resultado la hidrólisis oxidativa del contaminante de ácido teicoico residual, pero no afectó al polisacárido capsular de serotipo 8. La reacción se extinguió mediante la adición de etilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH2O para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0190] El segundo procedimiento se usó para producir polisacárido de cápsula sin el uso de enzimas para digerir las varias impurezas derivadas de célula. En el presente procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, el caldo de fermentación hidrolizado se clarificó por microfiltración seguida por ultrafiltración y diafiltración. La disolución se trató con carbono activado para eliminar impurezas. Después del tratamiento de carbono, el

material se trató con metaperyodato de sodio para oxidar el ácido teicoico residual seguido por una extinción con propilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH2O para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0191] Las preparaciones que se producen usando cualquiera de los procedimientos dieron como resultado unos polisacáridos capsulares puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico y ácido teicoico. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular deseados variando las condiciones de hidrólisis. En la tabla 2 a continuación se muestran unos ejemplos de polisacárido capsular que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Los lotes de polisacárido capsular de serotipo 8 purificado tenían una alta pureza tal como se indica por la ausencia de ácido teicoico (TA), peptidoglicano y proteína residual baja. Véase la tabla 2. El intervalo de pesos moleculares más bajos abarcaba de 20,4 kDa a 65,1 kDa, y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados (~100 %). Los niveles de contaminación de ácido nucleico eran bajos (de un 0,12 a un 2,45 %).

Tabla 2: Caracterización de las preparaciones de polisacárido capsular de serotipo 8.

Muestra	CP8 purificado total	MW	Proteína	Ácido Nuc.	O-Acetilo
	mg	(kDa) (g/mol)	(Lowry) % (p/p)	(barrido de 260 nm) % (p/p)	RMN %

1	310	27,0	1,2	0,94	100
2	438	29,0	2,4	2	100
3	179	20,4	0,37	0,12	108

[0192] Selección de peso molecular de los polisacáridos capsulares: Un análisis cinético mostró que un amplio intervalo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede generarse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Inicialmente, se produjeron unos polisacáridos más grandes mediante las células bacterianas, y posteriormente, un intervalo de peso molecular deseado puede seleccionarse y a continuación purificarse mediante la manipulación del pH y las condiciones de calor de las etapas de calentamiento y de hidrólisis.

[0193] El tratamiento térmico del caldo de fermentación de S. aureus es una etapa de procedimiento entre la fermentación y la recuperación de polisacárido capsular. Esta etapa de procedimiento usa calor para tratar el caldo de pH ajustado durante un periodo especificado. Los fines del tratamiento térmico a un pH bajo eran destruir células, inactivar enterotoxinas, liberar polisacárido unido a célula y reducir el peso molecular al tamaño deseado. Entre estos fines, la reducción de peso molecular era la menor en términos de tiempo de procesamiento requerido en esta etapa. Por lo tanto, los otros fines se lograron de forma inevitable dentro del plazo de tiempo del tratamiento considerado.

[0194] *Tratamiento térmico*: se determinaron las condiciones de pH y temperatura para seleccionar varios intervalos de peso molecular de los polisacáridos de cápsula. Se usó un fermentador Biolafitte de 15 l para estos estudios. El caldo de fermentación se transfirió al fermentador mediante una

bomba peristáltica. Usando una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm, el pH del caldo se ajustó con ácido sulfúrico concentrado. A continuación, la temperatura del caldo se elevó hasta el valor fijado. El tiempo de tratamiento térmico empezó en cuanto la temperatura alcanzó el punto fijado. Cuando se alcanzó el tiempo de tratamiento deseado, el caldo se enfrió hasta temperatura ambiente. Se tomaron muestras en procedimiento para determinar la concentración de polisacárido y el peso molecular mediante sistemas de HPLC y SEC-MALLS, respectivamente. Los datos del peso molecular (MW) se usaron en el análisis cinético. Los perfiles de MW se determinaron a lo largo del tiempo a un pH de 3,5, 4,0 y 5,0. Véase la figura 3A.

[0195] La cinética de hidrólisis ácida suave de polisacáridos se realizó usando polisacárido capsular de serotipo 8 purificado que se obtiene a partir del procedimiento. La disolución de polisacárido purificado se ajustó al pH deseado para el experimento con ácido sulfúrico. Aproximadamente 1,5 ml de la disolución se transfirió a cada uno de los tubos de centrífuga de 15 ml. Se colocaron los tubos en un baño de aceite equipado con un sistema de control de la temperatura de precisión. El tubo se sacó a un intervalo de tiempo predeterminado y se extinguió en un cubo de hielo. Al final del experimento, una alícuota de tampón Tris 1 M (pH 7,5) se añadió a la muestra para ajustar el pH de nuevo a aproximadamente 7. Las muestras se analizaron mediante un sistema SEC-MALLS. Los datos de MW se usaron en el análisis cinético. El efecto de la temperatura sobre el perfil de MW de CP8 a un pH de 3,5 se determinó a lo largo del tiempo. Véase la figura 3B.

Resultados

[0196] Tal como se muestra en la figura 3A, un pH más bajo era más eficaz para reducir el peso molecular del polisacárido. Pesos moleculares entre 300 kDa y 600 kDa pueden generarse usando un pH de 5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. De forma similar, pesos moleculares entre 250 kDa y 450 kDa pueden generarse usando un pH de 4 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. Además, pesos moleculares entre 120 kDa y 450 kDa pueden generarse usando un pH de 3,5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos.

[0197] Tal como se muestra en la figura 3B, cuanto más alta es la temperatura, más rápida es la velocidad de hidrólisis y más amplio es el intervalo de los pesos moleculares de polisacárido que se produce con el tiempo. El uso de una temperatura más baja, 55 °C frente a 95 °C al mismo pH, produce un intervalo más estrecho de pesos moleculares de polisacárido.

[0198] Además, la figura 4 muestra una correlación entre el peso molecular de CP8 purificado con el tiempo de tratamiento para hidrólisis ácida suave (pH 3,5 a 95 °C). El polisacárido purificado es el producto final que se obtiene a partir del procedimiento de recuperación detallado anteriormente. Como también se muestra en la figura 4, un aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa S. aureus PFESA0005 a un pH de 3,5 dio como resultado CP8 de peso molecular más bajo, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a un pH de 3,5 dieron como resultado CP8 de peso molecular más alto. El tamaño de los polisacáridos capsulares de serotipo 8 oscilaba de aproximadamente 80 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a un pH

de 3,5. La correlación entre el momento de tratamiento térmico a un pH bajo y el tamaño del CP8 purificado, tal como se muestra en la figura 4, permite una estimación del tiempo de tratamiento requerido para producir polisacárido purificado con un intervalo especificado de peso molecular.

[0199] Es importante indicar que tal como se muestra anteriormente el intervalo completo de pesos moleculares de polisacáridos capsulares de serotipo 8 de 20 kDa a más de 500 kDa puede producirse, liberarse y purificarse. Los procedimientos por lo tanto pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados tal como se muestra en la tabla 3. El intervalo relativamente estrecho de peso molecular de polisacárido que se produce cuando los pesos moleculares pico varían de 87 kDa a 108 kDa representa un intervalo bien caracterizado de pesos moleculares que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Un intervalo particularmente ventajoso de polisacáridos de alto peso molecular, variando de 70 kDa a 300 kDa o de 70 kDa a 150 kDa, es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando el polisacárido capsular con una proteína o molécula portadora (véase la tabla 3). Las condiciones que se usan para generar el polisacárido de cápsula CP8 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 80 a 120 kDa son tal como sigue: 95 °C, pH 3,5 durante 300 minutos.

Tabla 3: Producción de intervalo específico de polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular.

	Polisacárido capsular de serotipo, 8
Pase	MW (kDa)

1	98
2	89
3	108
4	108
5	89
6	100
1	99
2	113
3	105
4	100
5	87

Ejemplo 2: Conjugación de polisacáridos capsulares de serotipo 8 con CRM_{197}.

[0200] El presente ejemplo describe procedimientos y ensayos de caracterización que se usan en la producción de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus-CRM_{197}. Se desarrollaron diferentes químicas de conjugación para conjugar polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus con esta proteína de portador. Por ejemplo, conjugación usando PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida) da como resultado un enlace tioéter covalente entre el CP y la proteína de portador. Alternativamente, conjugación usando CDI/CDT (1,1-carboildiimidazol/1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre CP y proteína de portador.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 con CRM_{197} mediante química de conjugación de PDPH.

[0201] La química de conjugación de PDPH es un procedimiento de múltiples etapas que implica la activación del polisacárido, la eliminación del grupo protector de tiol, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación de la proteína CRM_{197}, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. Después de la introducción de un grupo tiol con contenido en ligador en el polisacárido y un grupo haloacetilo en el portador de proteína CRM_{197}, el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus se unió al portador de proteína a través de un enlace tioéter. S introdujeron grupos bromoacetilo en la proteína CRM_{197} mediante reacción de grupos amina con el éster de N-hidroxisuccimida de ácido bromoacético. Para generar polisacárido tiolado, los grupos carboxilato activados de carbodiimida de ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido se acoplaron con el grupo hidrazida del ligador heterobifuncional de hidrazida reactiva-sulfhidrilo 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH). Los tioles de PDPH-polisacárido tiolado, generados mediante reducción con DTT y purificados mediante SEC en una columna Sephadex G25, reaccionaron con los grupos bromoacetilo de proteína activada dando como resultado enlace covalente de tioéter formado mediante desplazamiento de bromo entre polisacárido y la proteína de portador. Los grupos bromoacetilo sin reaccionar se "taparon" con clorhidrato de cisteamina (clorhidrato de 2-aminoetanotiol). La mezcla de reacción se concentró a continuación y se sometió a diafriltración. Los grupos bromoacetilo no conjugados restantes se taparon con clorhidrato de

122

cisteamina para garantizar que no quedaba ningún grupo bromoacetilo reactivo tras la conjugación. Éste formó un enlace covalente entre el extremo de tiol de cisteamina y el grupo acetilo en el residuo de lisina tras el desplazamiento de bromo.

[0202] *1. Tiolación de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus con PDPH*: El polisacárido se activó en primer lugar mediante tiolación con PDPH. Se mezcló el polisacárido con una disolución madre de PDPH recién preparada (250 mg/ml en DMSO), una disolución madre de EDAC (90 mg/ml en diH2O), y disolución madre de tampón MES (0,5 M, pH 4,85) para fabricar la disolución final 0,1 M de MES, y 2 y 4 mg de polisacárido/ml mientras se mantiene una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de 1:0,6:1,25 para polisacárido capsular de serotipo 8. Se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se dializó frente a un volumen 1000Xde H2O destilada cuatro veces usando un dispositivo de diálisis 3500 MWCO a entre 4 °C y 8 °C para eliminar PDPH sin reaccionar. El polisacárido unido a PDPH se hizo DTT 0,2 M y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o durante la noche a entre 4 °C y 8 °C. Se separaron el DTT en exceso así como los productos secundarios de la reacción del sacárido activado mediante SEC usando resina Sephadex G25 y agua destilada como la fase móvil. Las fracciones se sometieron a ensayo mediante el ensayo de DTDP para grupos tiol y se agruparon las fracciones positivas que eluían cerca del volumen vacío de la columna. Se sometió a ensayo el conjunto de fracciones mediante los ensayos de PAHBAH y de O-acetilo para determinar el grado de activación que se expresa como un porcentaje molar de las unidades de repetición con contenido en un grupo

tiol (concentración molar de tioles/concentración molar de las unidades de repetición). Se liofilizó el polisacárido activado y se almacenó a -25 °C hasta que era necesario para la conjugación.

[0203] Los resultados de la reproducibilidad de la tiolación del polisacárido de serotipo 8 con PDPH se muestran en la tabla 4. El grado de activación de polisacárido de serotipo 8 estaba en el intervalo de un 12 % a un 16 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de polisacárido capsular frente a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Tabla 4: Activación de polisacárido capsular de serotipo 8 con PDPH - Estudio de reproducibilidad.

Polisacárido de serotipo 8-PDPH	Activación (% de MSH/MRU)	Escala, mg	Rendimiento, mg (%, p/p)
1	14	36	30 (83)
2	16	30	27 (91)
4	16	38	42 (110)
5	12	40	44 (110)

[0204] 2. *Activación de proteína de portador*: Por separado, se activó la proteína de portador mediante bromoacetilación. CRM_{197} se diluyó hasta 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM pH 7 (PBS) y a continuación se hizo NaHCO3 0,1 M pH 7,0 usando disolución madre 1 M. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS) se añadió a una razón CRM_{197} :BAANS 1:0,25 (p:p) usando una disolución madre de BAANS de DMSO 20 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a entre 4 y

8 °C durante 1 hora a continuación se purificó usando SEC sobre Sephadex G-25. El CRM_{197} activado purificado se sometió a ensayo mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y a continuación se diluyó con PBS hasta 5 mg/ml. Se añadió sacarosa a un 5 % p/vol como un crioprotector y se congeló la proteína activada y se almacenó a -25 °C hasta que era necesaria para la conjugación.

[0205] La bromoacetilación de residuos de lisina de CRM_{197} fue muy consistente, dando como resultado la activación de 19 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles (véase la tabla 5). La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Tabla 5: Rendimientos y grado de Bromoacetilación de CRM_{197}.

Preparación	Lisinas Activadas (n=)	Escala (mg)	Rendimiento (% p/p)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

[0206] *3. Coupling Reacción*: Una vez se prepararon el polisacárido de cápsula activado y la proteína de portador activada, se combinaron los dos en una reacción de conjugación. Se disolvió el polisacárido tiolado y liofilizado en borato 0,16 M pH 8,95, se mezcló CRM_{197} bromoacetilado descongelado y agua destilada para fabricar la disolución final de borato 0,1 M, razón 1:1 en p/p de CRM_{197}:polisacárido, y polisacárido 1 mg/ml. Se

incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante entre 16 y 24 horas. Se taparon los grupos bromoacetilo sin reaccionar en la proteína añadiendo clorhidrato de cisteamina en una razón de CRM_{197}:cisteamina de 1:2 (p/p) usando una disolución 135 mg/ml de cisteamina disuelta en borato 0,1 M pH 8,95 y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. El conjugado de polisacárido de cápsula-CRM_{197} (conjugado) se purificó mediante diafiltración 50 veces frente a NaCl al 0,9 % usando un ultrafiltro de polietersulfona de 100K.

[0207] Los resultados de la reproducibilidad de estudios de tiocilación de polisacárido capsular de serotipo 8 con PDPH mostraron que el grado de activación del polisacárido estaba en el intervalo de un 12 % a un 16 % lo que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de polisacárido frente a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 con CRM_{197} mediante química de conjugación de CDI/CDT.

[0208] CDI y CDT proporcionan un procedimiento de conjugación de una sola etapa en el que el polisacárido se activa en un entorno anhidro (DMSO) para formar imidazol o restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición de un portador de proteína (en DMSO) conduce al desplazamiento nucleofílico del imidazol o triazol mediante lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados).

[0209] Las químicas de conjugación tanto de CDI como CDT producían un polisacárido capsular de serotipo 8 con enlace covalente con la proteína de portador, que se indicaba por la presencia del sacárido y la proteína en las fracciones en cromatografía de exlusión molecular, y mediante análisis de aminoácidos de conjugado de clorhidrato de cisteamina tapado o glicolaldehído tapado.

[0210] El resumen de los resultados de la preparación de varios lotes de conjugados preparados mediante químicas tanto de PDPH como de CDI/CDT para el serotipo 8 capsular con tamaño de polisacárido en el intervalo de 20 kDa a 40 kDa se muestra en la tabla 6 a continuación. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos de conjugación. La antigenicidad de polisacárido conjugado capsular de serotipo 8 no se vio alterada por la conjugación tal como se representa mediante la línea de precipitinas de identidad entre conjugados y polisacárido nativo.

Tabla 6: Caracterización del polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} preparado mediante dos químicas de conjugación.

Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Razón de rendimiento	Libre azúcar (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificad
CDI/CDT	46-62	54-55	0,8-0,9	22-25	< 1	7-8
PDPH	34-70	61-83	0,6-0,9	15-41	ND	11-16

[0211] Tal como se muestra anteriormente, los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. Se buscaba preparar conjugados a partir de un intervalo preseleccionado de alto peso molecular que pudiera ser polisacárido capsular de serotipo 8 purificado y filtrado para su uso en composiciones inmunogénicas. La tabla 7 resume el análisis de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 en los que el peso molecular del polisacárido de cápsula de serotipo 8 oscilaba de aproximadamente 80 kDa a 120 kDa y se utilizó la química de conjugación de imidazol. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 595 kDa a 1.708 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM_{197} oscilaba de un número alto de 9 a un número bajo de 3. El polisacárido de cápsula libre oscilaba de un número alto de un 6 % a un número bajo de un 2 %.

Tabla 7: Conjugados con intervalo de peso molecular preseleccionado de polisacárido capsular de serotipo 8.

Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento (%)	Sac. libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas modificadas
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

[0212] Ambas químicas de conjugación producen un polisacárido capsular de serotipo 8 con enlace covalente con la proteína de portador. No hubo diferencias significativas en polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido capsular de serotipo 8-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

Ejemplo 3: Procedimiento en un solo recipiente frente a procedimiento de CDI/CDT complejo.

[0213] Tal como se describe anteriormente, los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol), CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida). El uso de CDI/CDT da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador, mientras que el uso de PDPH da como resultado un enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

[0214] El procedimiento basado en PDPH era un procedimiento de múltiples etapas que implicaba la activación del polisacárido, la eliminación de un grupo protector de tiol en el polisacárido, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación del portador de proteína, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. En el presente procedimiento, se hicieron reaccionar polisacáridos capsulares de serotipo 8 de S. aureus con PDPH y una carbodiimida en una disolución acuosa tal como MES 0,1 M para

producir polisacáridos unidos a PDPH. Los polisacáridos unidos a PDPH se hicieron reaccionar con un agente reductor para producir polisacáridos activados que se purificaron a continuación. Proteínas de portador se hicieron reaccionar con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético en una disolución acuosa para producir proteínas portadoras activadas que se purificaron a continuación. Los polisacáridos de serotipo 8 activados purificados se hicieron reaccionar a continuación con las proteínas portadoras activadas purificadas para producir conjugados de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador.

[0215] Por el contrario, los procedimientos basados en CDI- y CDT eran procedimientos de conjugación de una o dos etapas, en los que polisacárido capsular se activaba en un entorno anhidro (es decir, DMSO) para formar imidazol o restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición del portador de proteína (en DMSO) condujo a un desplazamiento nucleofílico del imidazol o triazol mediante lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Por consiguiente, se desarrollaron dos procedimientos basados en CDI- o CDT: un procedimiento más complejo y un procedimiento en un solo recipiente más sencillo. En el procedimiento más complejo, se combinaron polisacáridos capsulares de serotipo 8 de S. aureus con imidazol o triazol, se liofilizaron, y a continuación se hicieron reaccionar con CDI o CDT en un disolvente orgánico (tal como DMSO) para producir polisacáridos de serotipo 8 activados. Los polisacáridos de serotipo 8 activados se purificaron y a continuación se hicieron reaccionar con

proteínas portadoras en el disolvente orgánico para producir conjugados de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador. El procedimiento en un solo recipiente era similar al procedimiento complejo excepto en que los polisacáridos de serotipo 8 activados no se purificaban antes de la reacción con proteínas portadoras.

Procedimiento complejo de CDI/CDT.

[0216] *Activación de polisacárido*: Se mezcló polisacárido de serotipo 8 con 10 g de triazol/g de serotipo 8 y se liofilizó. Se disolvió la torta resultante en DMSO a 2,0 mg de polisacárido de serotipo 8/ml. Se determinó el contenido en agua. Una disolución recién preparada de CDT a 100 mg/ml en DMSO se añadió hasta conseguir una cantidad molar de CDT equivalente al agua. Alternativamente, la cantidad de CDT que se añade puede ajustarse para obtener un grado de activación más alto o más bajo. Esto se mantuvo 30 minutos a 23 °C.

[0217] *Purificación de polisacárido de serotipo 8 activado*: La disolución de serotipo 8 activado (ACP8) se vertió en 25 volúmenes de agua para destruir el CDT en exceso. Ésta se concentró hasta su volumen original sobre una membrana de PES de 10 kDa a aproximadamente 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a agua para al menos 10 volúmenes. Esta etapa se completó en menos de 4 horas. Se mezcló el material diafiltrado con 10 g de triazol/g de polisacárido de serotipo 8 original y se liofilizó.

[0218] *Preparación de CRM liofilizado*: CRM se sometió a diafiltración frente a NaCl al 0,4 %/sacarosa al 5 % a volumen constante sobre una membrana de PES de 10 kDa para al menos 10 volúmenes. La concentración de proteína se determinó y se añadió suficiente tampón de diafiltración para

llevar la concentración de proteína hasta 5,0 g/l, proporcionando de este modo una razón en p/p de NaCl/CRM = 0,8. Se liofilizó el CRM.

[0219] *Conjugación*: Polisacárido de serotipo 8 diafiltrado, activado, se disolvió en DMSO a 1 mg/ml. Disolución de borato a 100 mM se añadió para conseguir un 2 % v/v.

[0220] CRM volvió a suspenderse a 2 mg/ml y, cuando se completó la disolución, se combinó con la disolución de ACP8. Ésta se dejó reaccionar a 23 °C durante 20 horas.

[0221] Se vertió la reacción de conjugado en 24 volúmenes de borato 5 mM pH 9,0 y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se ajustó a pH 7,5 con tampón fosfato 0,5 M, pH 6,5. Ésta se filtró a través de un filtro de 5 micrómetros y se concentró hasta el volumen original sobre una membrana de PES de 300 kDa a una carga de ~ 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a al menos 10 volúmenes de agua. El concentrado resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

Procedimiento en un solo recipiente de CDI/CDT.

[0222] *Intercambio de matriz de CRM_{197}*: CRM_{197} se sometió a diafiltración para intercambiar de la matriz voluminosa de aproximadamente 10 mM fosfato/NaCl 80 mM/sacarosa al 15 %, pH de 7 a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %/ octil-β-D-glucósido 15 mM, pH 7. El intercambio permitió la eliminación de fosfato y sacarosa que son perjudiciales para la conjugación y define el contenido en cloruro de sodio portado en la conjugación. Se añade octil-β-D-glucopiranósido para prevenir la formación de partículas tras la filtración estéril.

[0223] La matriz de la CRM_{197} se intercambió mediante filtración de flujo tangencial frente a imidazol 5 mM/0,72 %/octil-B-D-glucopiranósido 15 mM pH 7 a través de 10 diavolúmenes usando membranas de PES de MWCO de 10K a una concentración de retentato de aproximadamente 4 mg/ml. La exposición de membrana típica era de 2 gramos/ft2 y la concentración de CRM_{197} final diana en la matriz fue de 6 mg/ml. La CRM_{197} se almacenó a 2 °C-8 °C.

[0224] *Activación/Conjugación*: El procedimiento de activación/conjugación para polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus consistió en las siguientes etapas: 1) Intercambio de matriz de la CRM_{197}; 2) Combinación del polisacárido; 3) Congelación superficial y liofilización de CRM_{197} y polisacárido combinado; 4) Disolución del polisacárido liofilizado y CRM_{197}; 5) Activación del polisacárido; 6) Conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}; y 7) Purificación del conjugado (dilución, diafiltración, filtración estéril).

[0225] El polisacárido se combinó con 10 gramos de excipiente de 1,2,4-triazol por gramo de polisacárido. El excipiente se añadió como un polvo al polisacárido, con una disolución que se obtiene tras menos de 15 minutos de mezclado a temperatura ambiente.

[0226] El polisacárido combinado y CRM_{197} se congelaron superficialmente por separado usando un baño de etanol a -75 °C. El volumen por frasco de 1 l era de aproximadamente 500 ml.

[0227] Para la disolución de polisacárido, Se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales del polisacárido para obtener una suspensión y a continuación se transfirió al recipiente de reacción de activación/conjugación

para calentar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Se obtuvo una disolución transparente a medida que la suspensión alcanzaba aproximadamente 45 °C con mezclado. La disolución se enfrió a continuación hasta 23 °C + 2 °C.

[0228] Para la disolución de CRM_{197}, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales con contenido en CRM_{197} para obtener una suspensión y a continuación se transfirió a un segundo recipiente para mezclar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Habitualmente se obtuvo una disolución transparente en menos de 15 minutos.

[0229] La disolución de polisacárido/DMSO se muestreó por el análisis de Karl Fischer para determinar el contenido en humedad. CDT se preparó como una disolución 100 mg/ml en DMSO y se añadió en base al contenido en humedad determinado. La adicón continua de la disolución de CDT se realizó a lo largo de aproximadamente 5 minutos a 23 °C + 2 °C con mezclado. Se dejó avanzar la reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C + 2 °C. La reacción se muestreó para determinar el nivel de activación (UV 220/205 nm) y a continuación se añadió borato de sodio 100 mM, pH 9 hasta obtener una disolución acuosa al 1,5 %. A continuación se agitó la disolución de reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C + 2 °C.

[0230] Para la conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}, se añadió DMSO hasta obtener una concentración de reacción de 0,8 mg/ml. el CRM_{197} disuelto en DMSO se añadió a continuación a la disolución de polisacárido activado con mezclado. Se agitó la reacción durante un mínimo de 4 horas a 23 °C + 2 °C.

[0231] La reacción disolución se diluyó 10X mediante su adición en tetraborato de sodio 5 mM , pH 9 con mezclado para hidrolizar grupos residuales de activación. La disolución diluida se pasó a través de un filtro de 5 µm y se concentró hasta una concentración de retentato diana de 2 g/l. Filtración de flujo tangencial se realizó usando membranas de celulosa regeneradas de 300K a través de 20 diavolúmenes con succinato 5 mM, pH 7. La exposición de membrana típica era de 1 gramo/ft2. El conjugado purificado se pasó a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

Ejemplo 4: Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 usando El procedimiento de conjugación en un solo recipiente y complejo.

[0232] El presente ejemplo muestra que el intervalo preseleccionado de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede usarse para conjugación o bien en el procedimiento en un solo recipiente o bien complejo. Los polisacáridos más grandes se producen inicialmente por las células bacterianas, y el intervalo de peso molecular purificado resultante puede controlarse mediante el pH y el calor del procedimiento de hidrólisis en el ejemplo 1 (tal como se muestra en la tabla 3).

[0233] En el presente ejemplo, ocho lotes en los que el peso molecular del polisacárido de cápsula de serotipo 8 oscilaba de aproximadamente 80 kDa a aproximadamente 120 kDa se seleccionaron y se realizó la conjugación usando activación con 1,1-carbonil-di-(1,2,4-triazol) para polisacárido capsular de serotipo 8. Véase la tabla 8. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 595 kDa a 1.708 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM oscilaba de un número alto de 13 a un número

bajo de 3. El azúcar libre oscilaba de un alto número de un 11 % a un bajo número de un 1 %.

Tabla 8: Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 preparados con polisacáridos capsulares de 80 kDa a 120 kDa.

Procedimiento	Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento de sac.(%)	Azúcar libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas
En un solo recipiente	1	98	86	1	751	11
	2	89	80	1	675	13
	3	108	76	4	1.073	5,0
	4	108	69	4	819	5,2
	5	89	85,1	8	1.708	10
	6	100	94,0	11	1.577	5
Complejo	1	99	88	6	943	4
	2	113	73	5	841	3
	3	105	79	3	719	7
	4	100	86	2	630	9
	5	87	90	3	595	6

Ejemplo 5: Evaluación del polisacárido capsular de serotipo 8 tratado con base y nativo conjugado en un modelo de bacteriemia murino.

[0234] La importancia de los grupos O-acetilo presentes en polisacárido capsular de serotipo 8 nativo se evaluó antes de la conjugación para

inducción de respuestas de anticuerpos funcionales para polisacárido capsular conjugados. El polisacárido capsular de serotipo 8 se O-desacetiló en condiciones básicas suaves, y tanto RMN como cromatografía iónica (CI) confirmaron la ausencia de O-acetilación en polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM. El conjugado de CP8 des-O-Ac-CRM se preparó mediante conjugación de polisacárido CP8 des-O-Ac con CRM mediante química de PDPH tal como se describe en el ejemplo 2.

[0235] El polisacárido capsular de serotipo 8 conjugado inesperadamente no mostró grupos acetilo medibles mediante el procedimiento de CI. Esto podría atribuirse a diferencias en la estructura, sitios de O-acetilación en comparación con otros polisacáridos capsulares de S. aureus, que a su vez podrían provocar la eliminación o modification de los grupos acetilo en polisacáridos capsulares de serotipo 8 durante la conjugación.

[0236] El modelo de bacteriemia murino se usó para evaluar la eficacia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo frente a tradao con base conjugado con CRM_{197}. Grupos de ratones BALB/c hembra (15/grupo) se vacunaron en las semanas 0, 3 y 6 con 1 mcg de polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM o 1 µg de polisacárido capsular de serotipo 8 O-Ac-CRM. Las vacunas se formularon con 22 mcg de AlPO4. Los animales se expusieron a S. aureus PFESA0003, y se contaron las bacterias de la sangre tres horas más tarde. Los datos mostraron que no había una reducción estadísticamente significativa ($p = 0,0362$) en ufc bacterianas recuperadas de la sangre de animales inmunizados con conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo sin tratar tal como se determina mediante la prueba de la t de Student (Tabla 9). En animales que se

inmunizaron con conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 tratado con base, las ufc bacterianas recuperadas de sangre fueron similares al grupo de control de solución salina.

Tabla 9: El conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} reduce la bacteriemia causada por S. aureus PFESA0003 en ratones.

Antígeno	Cepa/Dosis	LogUFC/Sangre	Significación (valor p)
Solución salina		4,35	
CP8 des-O-Ac-	PFESA0003	4,45	
CRM	1,14 x 108		
CP8 O-Ac-CRM		3,93	0,03

Ejemplo 6: Evaluación del polisacárido capsular de serotipo 8 nativo y tratado con base conjugado tratado en un modelo de bacteriemia murino.

[0237] Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 se evaluaron para determinar su capacidad para proteger a ratones en un modelo de pielonefritis. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición a S. aureus i.p. se redujeron significativamente en comparación con controles inmunizados con PBS.

[0238] Se llevaron a cabo dos estudios para evaluar la eficacia de conjugado de CP8-CRM_{197} en el modelo de bacteriemia murino, que se describe anteriormente, después de una exposición a S. aureus PFESA0268 (tipo 8). El primer estudio (figura 5) mostró una reducción significativa de bacteriemia ($p = 0,0308$). Para el estudio, grupos de ratones 6 a 8 Swiss Webster de 6 a 8 semanas de edad ($n = 30$) se inmunizaron de forma activa mediante

inyección subcutánea con 1 µg de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} y solución salina ambos formulados con 100 µg de AlPO4 a 0, 2 y 4 semanas y se exponen en la semana 6 por la vía intravenosa a S. aureus PFESA0268 (tipo 8). Antes de la exposición se realizaron experimentos para optimizar la dosis de cepa de exposición at the age ratones reach after tres vacunacións. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia se llevó a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

Ejemplo 7: Actividad opsónica de sueros de ratones inmunizados con Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 nativos y modificados químicamente.

[0239] Sueros de ratón seleccionados (n = 5) con altos títulos de polisacárido capsular de serotipo 8 de un estudio de vacunación se compararon para determinar la actividad opsónica usando la cepa PFESA0005. Los resultados de OPA (tabla 10) muestran que sólo conjugados preparados mediante la conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo provocaba anticuerpos opsónicos en ratones. Cabe destacar que el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 des-OAc era inmunogénico en ratones but los anticuerpos provocados no eran opsónicos en este ensayo. Los títulos de OPA se notifican como la inversa de la dilución a la que se observó una destrucción del 40 %.

Tabla 10: Actividad opsónica de sueros de ratón inmunizados con polisacárido capsular de serotipo 8 nativo frente a Polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM.

Polisacárido capsular de serotipo 8 Des-O-Ac-CRM	**Polisacárido capsular de serotipo 8-CRM**

título de OP Sem. 0 sueros	título de OP Sem. 8 sueros	título de OP Sem. 0 sueros	título de OP Sem. 8 sueros
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Ejemplo 8: La destrucción de cepas de S. aureus por antisueros de conjugado de serotipo 8 puede inhibirse mediante la adición de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo.

[0240] Para confirmar la especificidad de la destrucción, se realizó el enayo opsonofagocítico en presencia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo o polisacárido neumocócico no relacionado (Pn 14 poli), esencialmente tal como se describe anteriormente.

[0241] Los resultados (tabla 11) mostraron que la presencia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo en mezcla de reacción inhibía la destrucción opsonofagocítica de PFESA0286 de S. aureus (tipo 8). Estos resultados confirman que la destrucción opsonofagocítica mediante sueros inmunitarios está mediada por anticuerpos específicos de cápsula.

Tabla 11: Adición Polisacárido capsular de serotipo 8 Inhibits Destrucción opsonofagocítica de S. aureus mediante sueros inmunitarios.

Mono	Muestra de sueros	Título de OPA
	Sem. 0	< 50
02D133	Sem. 8	4.050
	Sem. 0 + 20 µg CP8 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg CP8 poli	< 50

	Sem. 0 + 20 µg Pn14 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg Pn 14 poli	4.050
	Sem. 0	< 50
A4N122	Sem. 8	4.050
	Sem. 0 + 20 µg CP8 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg CP8 poli	< 50
	Sem. 0 + 20 µg Pn14 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg Pn 14 poli	1.350

RESUMEN

[0242] Todas las químicas de conjugación produjeron polisacárido capsular de serotipo 8 con enlace covalente con la proteína de portador CRM_{197}. No hubo diferencias significativas en sacárido libre, razón de polisacárido capsular de serotipo 8-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos procedimientos.

Ejemplo 9: Preparación de polisacárido capsular de serotipo 5 de S.aureus.

[0243] En el presente ejemplo, se describe la producción de varios intervalos de tamaño de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus. La estructura de la unidad de repetición de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus se muestra en la figura 6. Los procedimientos que se describen en el presente documento son eficaces para producir polisacárido capsular de serotipo 5 con pesos moleculares que varían de aproximadamente 20 kDa a 800 kDa. Mediante una selección apropiada de las condiciones, pueden aislarse y purificarse polisacáridos capsulares de serotipo 5 de alto peso

molecular variando de 50 kDa a 800 kDa en peso molecular. Para su uso en composiciones inmunogénicas, puede aislarse y purificarse polisacárido capsular de serotipo 5 variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular, de 70 kDa a 150 kDa y muchos otros intervalos deseados. La cepa PFESA0266 see seleccionó para la producción de polisacárido capsular de serotipo 5 en base a las características de crecimiento y a la cantidad de cápsula que se produce.

[0244] Para la producción de polisacárido capsular de serotipo 5, se hizo que la cepa PFESA0266 creciera en un medio complejo que consiste principalmente en una fuente de carbono (o bien lactosa o bien sacarosa), harina de soja hidrolizada como la fuente de nitrógeno, y trazas de metales. Se hizo que la cepa creciera en biorreactores durante de 2 a 5 días.

[0245] La fermentación de la cepa PFESA0266 se llevó a cabo tal como se detalló anteriormente. En el momento de la recogida, la DO 600 del cultivo era de 7,38. El cultivo se trató en autoclave durante 1 hora y tras enfriar, se procesó el cultivo tal como se describe anteriormente para separar las células del material sobrenadante. Se recuperó aproximadamente 1 l de cada uno de las céluas y del sobrenadante filtrado y concentrado.

[0246] Antes del procesado en autoclave, una muestra se retiró para someter a prueba el nivel de la enterotoxina estafilocócica B (SEB) en el cultivo. En presencia de un 0,05 % de Polysorbate 80, la concentración de SEB en la fermentación fue de 15 a 20 ng/ml. Experimentos previos mostraron que el procesado en autoclave del cultivo durante 1 hora redujo el nivel de SEB a menos de 0,1 ng/ml, que se encuentra por debajo del límite de detección para el kit TECRA.

[0247] Un polisacárido fraccionado en etanol, diafiltrado, se cargó en una columna Q-Sepharose AEC y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl tal como se describe anteriormente. Las fracciones se analizaron mediante el ensayo de O-Acetilo y una prueba de doble inmunodifusión para determinar la presencia de polisacárido de serotipo 5 y un ensayo de fosfato para determinar la presencia de ácido teicoico. La presencia de polisacárido de serotipo 5 se detectó en las fracciones 60 a 105 (figuras 7A y B). Para reducir la contaminación con ácido teicoico, las fracciones 60 a 85 se agruparon y cualquier ácido teicoico residual se oxidó con metaperyodato de sodio para permitir su eliminación mediante diafiltración de 3K frente a diH2O.

[0248] La purificación de polisacárido capsular de serotipo 5 que se usa para la preparación de conjugados se realizó mediante dos procedimientos diferentes que se basan en una temperatura elevada y en un pH bajo para afectar a la liberación de cápsula a partir de la célula y reducir el peso molecular del polisacárido. El peso molecular resultante dependía del momento, la temperatura y el pH de la etapa de hidrólisis.

[0249] La caracterización del polisacárido capsular de serotipo 5 se realizó usando las técnicas que se especifican en la tabla 1, citado anteriormente.

[0250] Los polisacáridos de cápsula que se producen mediante los procedimientos que se describen a continuación dan como resultado polisacáridos puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico, peptidoglicano y ácido teicoico.

[0251] En el primer procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso

molecular, la preparación se trató con un cóctel de enzimas (por ejemplo, ribonucleasa, desoxiribonucleasa, lisozima y proteasa) para digerir impurezas. Después de la incubación, las impurezas residuales se precipitaron mediante la adición de etanol (concentración final de aproximadamente un 25 %). Después de la eliminación del etanol residual, una disolución con contenido en un polisacárido de cápsula se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y se eluyó con un gradiente de sal lineal. Las fracciones con contenido en polisacárido de cápsula se agruparon y se trataron con metaperyodato de sodio. Este tratamiento dio como resultado la hidrólisis oxidativa del contaminante de ácido teicoico residual, pero no afectó al polisacárido capsular de serotipo 5. La reacción se extinguió mediante la adición de etilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a agua destilada (dH20) para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0252] El segundo procedimiento se usó para producir polisacárido de cápsula sin el uso de enzimas para digerir las varias impurezas derivadas de célula. En el presente procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, el caldo de fermentación hidrolizado se clarificó por microfiltración seguida por ultrafiltración y diafiltración. La disolución se trató con carbono activado para eliminar impurezas. Después del tratamiento de carbono, el material se trató con metaperyodato de sodio para oxidar el ácido teicoico residual seguido por una extinción con propilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH2O para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0253] Las preparaciones que se producen usando cualquiera de los procedimientos dieron como resultado unos polisacáridos capsulares puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico y ácido teicoico. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular deseados manipulando las condiciones de hidrólisis.

[0254] Ejemplos de polisacárido capsular que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento se muestran en la tabla 12 a continuación. Los lotes de polisacárido capsular de serotipo 5 purificado tenían una alta pureza tal como se indica por la ausencia de ácido teicoico (TA), peptidoglicano y proteína residual baja. Véanse las tablas 12 y 13. El intervalo de pesos moleculares abarcaba de 132,7 kDa a 800 kDa y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados, variando de un 90 % a un 100 %, y estaban un 100 % N-acetilados.

Los rendimientos de la purificación del polisacárido capsular de serotipo 5 eran de un 39 % a un 63 %, y el tamaño de polisacárido purificado de serotipo 5 variaba de 35 kDa a 65 kDa (véase la tabla 12). El nivel de contaminación por ácido teicoico (TA) era aceptable y los niveles de proteínas residuales y ácido nucleico estaban también en intervalos aceptables. Espectros de RMN de polisacárido de serotipo 5 eran idénticos a los notificados en la bibliografía.

Tabla 12: Caracterización de polisacárido capsular de serotipo 5.

Muestra	CP5 total purificado	Rendimiento	MW	Proteína	Ácido Nuc.	O-acetilo
	mg	%	(kDa)	% (p/p)	(barrido	RMN

			(g/mol)		de 260 nm) % (p/p)	(%)
1	101	39	47	0	0,5	94
2	91	48	65	1,2	2,5	96
3	578	63	35	2,5	0,7	75

Tabla 13: Caracterización de polisacárido capsular de serotipo 5 adicional.

Muestra	MW (kDa)	CP5 (mg/ml)	RMN de O-acetilo (%)	Identidad según RMN	RMN de N-acetilo (%)
1	800,1	3,164	100	Pasa	100
2	132,7	1,172	90	Pasa	100
3	335,4	0,975	90	Pasa	100
4	366,8	0,865	90	Pasa	ND

ND = no detectado

[0255] *Selección de peso molecular de los polisacáridos capsulares*: Un análisis cinético mostró que un amplio intervalo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede generarse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Inicialmente, se produjeron unos polisacáridos más grandes mediante las células bacterianas, y posteriormente, un intervalo de peso molecular deseado puede seleccionarse y a continuación purificarse mediante la manipulación del pH y las condiciones de calor de las etapas de calentamiento y de hidrólisis.

[0256] El tratamiento térmico del caldo de fermentación de S. aureus es una etapa de procedimiento entre la fermentación y la recuperación de

polisacárido capsular. Esta etapa de procedimiento usa calor para tratar el caldo de pH ajustado durante un periodo especificado. Los fines del tratamiento térmico a un pH bajo eran destruir células, inactivar enterotoxinas, liberar polisacárido unido a célula y reducir el peso molecular al tamaño deseado. Entre estos fines, la reducción de peso molecular era la menor en términos de tiempo de procesamiento requerido en esta etapa. Por lo tanto, los otros fines se lograron de forma inevitable dentro del plazo de tiempo del tratamiento considerado.

[0257] *Tratamiento térmico*: se determinaron condiciones de pH y temperatura para seleccionar varios intervalos de peso molecular de los polisacáridos de cápsula. Se usó un fermentador Biolafitte de 15 l para estos estudios. El caldo de fermentación se transfirió al fermentador mediante una bomba peristáltica. Usando una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm, el pH del caldo se ajustó con ácido sulfúrico concentrado. A continuación, la temperatura del caldo se elevó hasta el valor fijado. El tiempo de tratamiento térmico empezó en cuanto la temperatura alcanzó el punto fijado. Cuando se alcanzó el tiempo de tratamiento deseado, el caldo se enfrió hasta temperatura ambiente. Se tomaron muestras en procedimiento para determinar la concentración de polisacárido y el peso molecular mediante sistemas de HPLC y SEC-MALLS, respectivamente. Los datos del peso molecular (MW) se usaron en el análisis cinético. Los perfiles de MW se determinaron a lo largo del tiempo a un pH de 3,5, 4,0 y 5,0. Véase la figura 8A.

[0258] La cinética de hidrólisis ácida suave de polisacáridos se realizó usando polisacárido capsular de serotipo 8 purificado que se obtiene a partir

del procedimiento. La disolución de polisacárido purificado se ajustó al pH deseado para el experimento con ácido sulfúrico. Aproximadamente 1,5 ml de la disolución se transfirió a cada uno de los tubos de centrífuga de 15 ml. Se colocaron los tubos en un baño de aceite equipado con un sistema de control de la temperatura de precisión. The tubos se sacaron a intervalos de tiempo predeterminados y se extinguieron en un cubo de hielo. Al final del experimento, una alícuota de tampón Tris 1 M (pH 7,5) se añadió a la muestra para ajustar el pH de nuevo a aproximadamente 7. Las muestras se analizaron mediante un sistema SEC-MALLS. Los datos de MW se usaron en el análisis cinético. El efecto de la temperatura sobre el perfil de MW de CP5 a un pH de 4,5 se determinó a lo largo del tiempo. Véase la figura 8B.

Resultados

[0259] Tal como se muestra en la figura 8A, un pH más bajo era más eficaz para reducir el peso molecular del polisacárido. En el presente ejemplo, intervalos de pesos moleculares entre aproximadamente 300 kDa y aproximadamente 600 kDa pueden generarse usando un pH de 5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. Véase la figura 8A. De forma similar, elegir un pH de 4,5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede proporcionar intervalos de peso molecular de polisacárido entre 200 kDa y 400 kDa. Además, elegir un pH de 4,0 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede proporcionar intervalos de peso molecular de polisacárido entre 120 kDa y 300 kDa.

[0260] Tal como se muestra en la figura 8B, cuanto más alta es la temperatura, más rápida es la velocidad de hidrólisis y más anchos son los pesos moleculares de polisacárido que se producen con el tiempo.

Expresado de otra forma, el uso de una temperatura más baja, 55 °C frente a 95 °C al mismo pH, produce un intervalo más estrecho de pesos moleculares de polisacárido.

[0261] Además, la figura 4 muestra una correlación entre el peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 purificado con el tiempo de tratramiento para hidrólisis ácida suave (pH 4,5 a 95 °C). El polisacárido purificado es el producto final que se obtiene a partir del procedimiento de recuperación detallado anteriormente. Como también se muestra en la figura 4, un aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa de S. aureus PFESA0266 a un pH de 4,5 dio como resultado polisacárido capsular de serotipo 8 de menor peso molecular, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a un pH de 4,5 dio como resultado polisacárido capsular de serotipo 5 de mayor peso molecular. El tamaño de polisacáridos capsulares de serotipo 5 oscilaba de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a un pH de 4,5. Una correlación entre el momento de tratamiento térmico a un pH bajo y el tamaño de los polisacáridos capsulares de serotipo 5 purificados, tal como se muestra en la figura 4, permite una estimación del tiempo de tratamiento requerido para producir polisacárido purificado con un intervalo especificado de peso molecular.

[0262] Tal como se muestra anteriormente, el intervalo completo de pesos moleculares de polisacáridos capsulares de serotipo 5 de 20 kDa a más de 500 kDa puede producirse, liberarse y purificarse. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados tal como se

muestra en la tabla 14. El intervalo relativamente estrecho de peso molecular de polisacárido que se produce cuando los pesos moleculares pico varían de 63 kDa a 142 kDa representa un intervalo bien caracterizado de pesos moleculares que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Un intervalo particularmente ventajoso de polisacáridos de alto peso molecular, variando de 70 kDa a 300 kDa o de 70 kDa a 150 kDa, es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando el polisacárido capsular con una proteína o molécula portadora. Las condiciones que se usan para generar el polisacárido de cápsula de CP5 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 100 a 140 kDa son tal como sigue: 95 °C, pH 4,5 durante 135 minutos. Diferentes combinaciones de pH, temperatura, y tiempo, no obstante, generarán también moléculas de CP5 con un intervalo de peso molecular de aproximadamente 100 a 140 kDa.

Tabla 14: Producción de intervalo específico de Alto peso molecular Polisacárido capsular de serotipo 5.

	Polisacárido capsular de serotipo 5,
Pase	**MW (kDa)**
1	142
2	108
3	142
4	108
5	ND
6	ND
7	63

Pase	Polisacárido capsular de serotipo 5, MW (kDa)
8	72
9	74
10	63
11	ND

ND = no realizado

Ejemplo 10: Conjugación de polisacáridos capsulares de serotipo 5 con CRM_{197}.

[0263] El presente ejemplo describe procedimientos y ensayos de caracterización que se usan en la producción de conjugados polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus-CRM_{197}. Se desarrollaron diferentes químicas de conjugación para conjugar polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus con esta proteína de portador. Por ejemplo, la conjugación usando PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida) da como resultado enlace tioéter covalente entre el CP y la proteína de portador; mientras que la conjugción usando CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 con CRM_{197} mediante química de conjugación de PDPH.

[0264] La química de conjugación de PDPH es un procedimiento de múltiples etapas que implica la activación del polisacárido, la eliminación del grupo protector de tiol, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación de la proteína CRM_{197}, y la

conjugación de los componentes activados seguido por purificación. Después de la introducción de un grupo tiol con contenido en ligador en el polisacárido y un grupo haloacetilo en el portador de proteína CRM_{197}, el polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus se unió al portador de proteína a través de un enlace tioéter. Se introdujeron grupos bromoacetilo en la proteína CRM_{197} mediante reacción de grupos amina con el éster de N-hidroxisuccimida de ácido bromoacético. Para generar polisacárido tiolado, los grupos carboxilato activados de carbodiimida de ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido se acoplaron con el grupo hidrazida del ligador heterobifuncional de hidrazida reactiva-sulfhidrilo 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH). Los tioles de PDPH-polisacárido tiolado, generados mediante reducción con DTT y purificados mediante SEC en una columna Sephadex G25, reaccionaron con los grupos bromoacetilo de proteína activada dando como resultado enlace covalente de tioéter formado mediante desplazamiento de bromo entre polisacárido y la proteína de portador. Los grupos bromoacetilo sin reaccionar se "taparon" con clorhidrato de cisteamina (clorhidrato de 2-aminoetanotiol). La mezcla de reacción se concentró a continuación y se sometió a diafriltración. Los grupos bromoacetilo no conjugados restantes se taparon con clorhidrato de cisteamina para garantizar que no quedaba ningún grupo bromoacetilo reactivo tras la conjugación. Éste formó un enlace covalente entre el extremo de tiol de cisteamina y el grupo acetilo en el residuo de lisina tras el desplazamiento de bromo.

[0265] 1. *Tiolación de Polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus con PDPH*: El polisacárido se activó en primer lugar mediante tiolación con

PDPH. Se mezcló el polisacárido con una disolución madre de PDPH recién preparada (250 mg/ml en DMSO), una disolución madre de EDAC (90 mg/ml en diH2O), y disolución madre de tampón MES (0,5 M, pH 4,85) para fabricar la disolución final 0,1 M de MES, y 2 mg y 4 mg de polisacárido capsular/ml mientras se mantiene una razón en peso de polisacárido capsular:PDPH:EDAC de 1:5:3 para polisacárido capsular de serotipo 5. Se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se dializó frente a un volumen 1000X de H2O destilada cuatro veces usando un dispositivo de diálisis 3500 MWCO a entre 4 °C y 8 °C para eliminar PDPH sin reaccionar. El polisacárido unido a PDPH se hizo DTT 0,2 M y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o durante la noche a entre 4 °C y 8 °C. Se separaron el DTT en exceso así como los productos secundarios de la reacción del sacárido activado mediante SEC usando resina Sephadex G25 y agua destilada como la fase móvil. Las fracciones se sometieron a ensayo mediante el ensayo de DTDP para grupos tiol y se agruparon las fracciones positivas que eluían cerca del volumen vacío de la columna. Se sometió a ensayo el conjunto de fracciones mediante los ensayos de PAHBAH y de O-acetilo para determinar el grado de activación, que se expresa como un porcentaje molar de las unidades de repetición con contenido en un grupo tiol (concentración molar de tioles/concentración molar de las unidades de repetición). Se liofilizó el polisacárido activado y se almacenó a -25 °C hasta que era necesario para la conjugación.

[0266] Los resultados de la reproducibilidad de la tiocilación de polisacárido de serotipo 5 con PDPH se muestran en la tabla 15. El grado de activación de polisacárido de serotipo 5 estaba en el intervalo de un 11 % a un 19 %, lo

que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de polisacárido capsular frente a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Tabla 15: Activación de polisacárido capsular de serotipo 5 con PDPH - Estudio de reproducibilidad.

Polisacárido de serotipo 5-PDPH	**Activación (% de MSH/MRU)**	**Escala, mg**	**Rendimiento, mg (%, p/p)**
1	11	23	19,6 (85)
2	13	30	28 (93)
3	19	30	23 (77)
4	15	32	29 (90)

[0267] *2. Activación de proteína de portador*: Por separado, se activó la proteína de portador mediante bromoacetilación. CRM_{197} se diluyó hasta 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM pH 7 (PBS) y a continuación se hizo NaHCO3 0,1 M pH 7,0 usando disolución madre 1 M. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS) se añadió a una razón CRM_{197}:BAANS 1:0,25 (p:p) usando una disolución madre de BAANS de DMSO 20 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a entre 4 y 8 °C durante 1 hora a continuación se purificó usando SEC sobre Sephadex G-25. El CRM_{197} activado purificado se sometió a ensayo mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y a continuación se diluyó con PBS hasta 5 mg/ml. Se añadió sacarosa a un 5 % p/vol como un crioprotector y se congeló la proteína activada y se almacenó a -25 °C hasta que era necesaria para la conjugación.

[0268] La bromoacetilación de residuos de lisina de CRM_{197} fue muy consistente, dando como resultado la activación de 19 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles (véase la tabla 16). La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Tabla 16: Rendimientos y grado de bromoacetilación de CRM_{197}.

Preparación	**Lisinas activadas (n =)**	**Escala (mg)**	**Rendimiento (% p/p)**
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

[0269] *3. Reacción de acoplamiento*: Una vez se prepararon el polisacárido de cápsula activado y la proteína de portador activada, se combinaron los dos en una reacción de conjugación. Se disolvió el polisacárido tiolado y liofilizado en borato 0,16 M pH 8,95, se mezcló CRM_{197} bromoacetilado descongelado y agua destilada para fabricar la disolución final de borato 0,1 M, razón 1:1 en p/p de CRM_{197}:polisacárido, y polisacárido capsular de serotipo 5 2 mg/ml. Se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante entre 16 y 24 horas. Se taparon los grupos bromoacetilo sin reaccionar en la proteína añadiendo clorhidrato de cisteamina en una razón de CRM_{197}:cisteamina de 1:2 (p/p) usando una disolución 135 mg/ml de cisteamina disuelta en borato 0,1 M pH 8,95 y se incubó durante 4 horas a

temperatura ambiente. El conjugado de polisacárido de cápsula-CRM_{197} (conjugado) se purificó mediante diafiltración 50 veces frente a NaCl al 0,9 % usando un ultrafiltro de polietersulfona de 100K.

[0270] Los resultados de la reproducibilidad de los estudios de tiolación de polisacárido capsular de serotipo 5 con PDPH mostraron que el grado de activación estaba en el intervalo de un 11 % a un 19 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de CP con respecto a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 con CRM_{197} mediante química de conjugación de CDT.

[0271] CDT proporciona un procedimiento de conjugación de una sola etapa en el que el polisacárido se activa en un entorno anhidro (DMSO) para formar restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición de un portador de proteína (en DMSO) conduce al desplazamiento nucleofílico del triazol mediante lisinas y formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Se diluye la disolución de reacción 10 veces en una disolución acuosa en preparación para purificación mediante filtración de flujo tangencial.

[0272] La química de conjugación de CDT produjo un polisacárido capsular de serotipo 5 con enlace covalente con la proteína de portador, que se indicaba por la presencia del sacárido y la proteína en las fracciones en cromatografía de exlusión molecular, y mediante análisis de aminoácidos de conjugado de clorhidrato de cisteamina tapado o glicolaldehído tapado.

[0273] Un resumen de los resultados de la preparación de varios lotes de conjugados preparados mediante químicas tanto de PDPH como de CDT para tamaños de polisacárido capsular de serotipo 5 en el intervalo de 20 kDa a 40 kDa se muestra en la tabla 17 a continuación. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estas químicas de conjugación. La antigenicidad de polisacárido conjugado capsular de serotipo 5 no se vio alterada por la conjugación tal como se representa mediante la línea de precipitinas de identidad entre conjugados y polisacárido nativo.

Tabla 17: Caracterización del polisacárido capsular de serotipo 5-CRM_{197} preparado mediante dos químicas de conjugación.

Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Razón de rendimiento	Azúcar libre (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificadas
CDT	19-27	35	0,5-0,8	10-40	< 1	18-22
PDPH	26-52	40-99	0,4-1,0	23-50	ND	ND

ND = no detectado

[0274] Tal como se muestra anteriormente, los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. Se buscaba preparar conjugados a partir de un intervalo

preseleccionado de alto peso molecular que pudiera ser filtrado y polisacárido capsular de serotipo 5 purificado para su uso en composiciones inmunogénicas. La tabla 18 resume el análisis de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 en los que el peso molecular de polisacárido de cápsula de serotipo 5 oscilaba de aproximadamente 92 kDa a aproximadamente 119 kDa y activado con triazol (CDT). Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 1.533 kDa a 2.656. El número de lisinas conjugadas por CRM_{197} oscilaba de un alto número de 22 a un bajo número de 15. El polisacárido de cápsula libre oscilaba de un alto número de un 18 % a un bajo número de un 11 %.

Tabla 18: Conjugados con intervalo de peso molecular preseleccionado de polisacárido capsular de serotipo 5.

Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento (%)	Sac. libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas modificadas
1	121	63	11	2.130	19
2	92	72	16	1.533	22
3	119	74	14	2.656	15
4	115	63	18	1.911	15

[0275] Ambas químicas de conjugación producen un polisacárido capsular de serotipo 5 con enlace covalente con proteína de portador. No hubo diferencias significativas en polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido capsular de serotipo 5-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

Ejemplo 11: Complejo frente a procedimientos de CDT en un solo recipiente.

[0276] Tal como se describe anteriormente, los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida). El uso de CDT dio como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador, mientras que el uso de PDPH da como resultado un ligador de cinco carbonos con contenido en enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

[0277] El procedimiento basado en PDPH era un procedimiento de múltiples etapas que implicaba la activación del polisacárido, la eliminación de un grupo protector de tiol en el polisacárido, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación del portador de proteína, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. En el presente procedimiento, polisacáridos capsulares de serotipo 5 de S. aureus se hicieron reaccionar con PDPH y una carbodiimida en un disolvente orgánico tal como DMSO para producir polisacáridos unidos a PDPH. Los polisacáridos unidos a PDPH se hicieron reaccionar con un agente reductor para producir polisacáridos activados que se purificaron a continuación. Proteínas de portador se hicieron reaccionar con ácido bromoacético en un disolvente orgánico para producir proteínas portadoras activadas que se purificaron a continuación. Los polisacáridos de

serotipo 5 activados purificados se hicieron reaccionar a continuación con las proteínas portadoras activadas purificadas para producir conjugados de polisacárido de serotipo 5-proteína portadora.

[0278] Por el contrario, los procedimientos basados en CDT eran procedimientos de conjugación de una sola etapa, en la el polisacárido capsular se activaba en un entorno anhidro (es decir, DMSO) para formar restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición del portador de proteína (en DMSO) condujo a un desplazamiento nucleofílico del imidazol o triazol mediante lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados), permitiendo de ese modo que proceda la conjugación en "un solo recipiente". Por consiguiente, se desarrollaron dos procedimientos basados en CDT: un procedimiento más complejo y un procedimiento en un solo recipiente más sencillo. En el procedimiento más complejo, se combinaron polisacáridos capsulares de serotipo 5 de S. aureus con imidazol o triazol y a continuación se hicieron reaccionar con CDT en un disolvente orgánico (tal como DMSO) y aproximadamente un 0,2 % p/v de agua para producir polisacáridos de serotipo 5 activados. Los polisacáridos de serotipo 5 activados se purificaron y a continuación se hicieron reaccionar con proteínas portadoras en el disolvente orgánico para producir conjugados de polisacárido de serotipo 5-proteína portadora. El procedimiento en un solo recipiente era similar al procedimiento complejo excepto en que los polisacáridos de serotipo 5 activados no se purificaban antes de la reacción con proteínas portadoras.

(A)

Procedimiento de CDT complejo

[0279] *Activación de polisacárido capsular de serotipo 5*: Se mezcló polisacárido capsular de serotipo 5 con 10 g de triazol/g de polisacárido capsular de serotipo 5 y se liofilizó. Se disolvió la torta resultante en DMSO a 2,0 mg de polisacárido capsular de serotipo 5/ml. Se determinó el contenido en agua y se ajustó a 0,2 %. Una disolución recién preparada de CDT a 100 mg/ml en DMSO se añadió para conseguir una cantidad de CDT en un exceso molar de 20 veces en comparación con la cantidad de CP5. Alternativamente, la cantidad de CDT que se añade puede ajustarse para obtener un grado de activación más alto o más bajo. Esto se mantuvo 30 minutos a 23 °C.

[0280] *Purificación de polisacárido de serotipo 5 activado capsular*: La disolución de polisacárido de serotipo 5 activado capsular (ACP5) se vertió en 25 volúmenes de agua para destruir el CDT en exceso. Ésta se concentró hasta su volumen original sobre una membrana de PES de 10 kDa a aproximadamente 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a agua para al menos 10 volúmenes. Esta etapa se completó en menos de 4 horas. Se mezcló el material diafiltrado con 10 g de triazol/g de polisacárido de serotipo 5 original y se liofilizó.

[0281] *Preparación de CRM liofilizado*: CRM se sometió a diafiltración frente a NaCl al 0,4 %/sacarosa al 5 % a volumen constante sobre una membrana de PES de 10 kDa para al menos 10 volúmenes. La concentración de proteína se determinó y se añadió suficiente tampón de diafiltración para llevar la concentración de proteína hasta 5,0 g/l, proporcionando de este modo una razón en p/p de NaCl/CRM = 0,8. Se liofilizó el CRM.

[0282] *Conjugación*: Se disolvió polisacárido capsular de serotipo 5 activado, diafiltrado, en DMSO a 1 mg/ml. Se añadió disolución de borato a 100 mM para conseguir un 2 % v/v.

[0283] CRM volvió a suspenderse a 2 mg/ml y, cuando se completó la disolución, se combinó con la disolución de ACP5. Ésta se dejó reaccionar a 4 °C durante 20 horas.

[0284] Se vertió la reacción de conjugado en 24 volúmenes de borato 5 mM pH 9,0 y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se ajustó a pH 7,5 con tampón fosfato 0,5 M, pH 6,5. Ésta se filtró a través de un filtro de 5 micrómetros y se concentró hasta el volumen original sobre una membrana de PES de 300 kDa a una carga de ~ 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a al menos 10 volúmenes de agua. El concentrado resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

Procedimiento de en un solo recipiente de CDT

[0285] *Intercambio de matriz de CRM_{197}*: CRM_{197} se sometió a diafiltración para intercambiar de la matriz voluminosa de fosfato aproximadamente 10 mM/NaCl 80 mM/sacarosa al 15 %, pH de 7 a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %,/octil-β-D-glucopiranósido 15 mM, pH 7. El intercambio permitió la eliminación de fosfato y sacarosa que son perjudiciales para la conjugación y define el contenido en cloruro de sodio portado en la conjugación. Se añade octil-β-D-glucopiranósido para prevenir la formación de partículas tras la filtración estéril.

La matriz de la CRM_{197} se intercambió mediante filtración de flujo tangencial frente a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %/octil-β-D-glucopiranósido 15 mM, pH

7 a través de 10 diavolúmenes usando membranas de PES de MWCO de 10K a una concentración de retentato de aproximadamente 4 mg/ml. La exposición de membrana típica era de 2 gramos/ft2 y la concentración de CRM_{197} final diana en la matriz era de 6 mg/ml. La CRM_{197} se almacenó a 2 °C-8 °C.

[0286] *Activación/Conjugación*: El procedimiento de activación/conjugación para polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus consistió en las siguientes etapas: 1) Combinación del polisacárido; 2) Congelación superficial y liofilización de CRM_{197} y polisacárido combinado; 3) Disolución del polisacárido liofilizado y CRM_{197}; 4) Activación del polisacárido; 5) Conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}; y 6) Purificación del conjugado (dilución, diafiltración, filtración estéril).

[0287] El polisacárido se combinó con 10 gramos de excipiente de 1,2,4-triazol por gramo de polisacárido. El excipiente se añadió como un polvo al polisacárido, con una disolución que se obtiene tras menos de 15 minutos de mezclado a temperatura ambiente.

[0288] El polisacárido combinado y CRM_{197} se congelaron superficialmente por separado usando un baño de etanol a -75 °C. El volumen por frasco de 1 l era de aproximadamente 500 ml.

[0289] Para la disolución de polisacárido, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales del polisacárido para obtener una suspensión y a continuación se transfirió al recipiente de reacción de activación/conjugación para calentar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Se obtuvo una disolución transparente tras 5 a 10 minutos de mezclado.

[0290] Para la disolución de CRM_{197}, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales con contenido en CRM_{197} para obtener una suspensión y a continuación se transfirió a un segundo recipiente para mezclar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Habitualmente se obtuvo una disolución transparente en menos de 15 minutos.

[0291] La disolución de polisacárido/DMSO se muestreó por el análisis de Karl Fischer para determinar el contenido en humedad. CDT se preparó como una disolución 100 mg/ml en DMSO y se añadió a un exceso molar de 5 con respecto a polisacárido de tipo 5 (el procedimiento complejo usaba 20 equivalentes molares de CDT mientras que el procedimiento en un solo recipiente usaba 5 equivalentes molares de CDT:CP5). La adicón continua de la disolución de CDT se realizó a lo largo de aproximadamente 5 minutos a 23 °C + 2 °C con mezclado. Se dejó avanzar la reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C ± 2 °C. La reacción se muestreó para determinar el nivel de activación (UV 220/205 nm) y a continuación se añadió borato de sodio 100 mM, pH 9 hasta obtener una disolución acuosa al 1,5 %. A continuación se agitó la disolución de reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C + 2 °C.

[0292] Para la conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}, DMSO se añadió para obtener una concentración de reacción de 0,55 mg/ml. El CRM_{197} disuelto en DMSO se añadió a continuación a la disolución de polisacárido activado con mezclado. Se agitó la reacción durante un mínimo de 16 horas a 23 °C + 2 °C.

[0293] La reacción disolución se diluyó 10X con tetraborato de sodio 5 mM, pH 8,6 para obtener un pH diluido final de 9 ± 0,2. La disolución se agitó a 23 ± 3 ºC durante un mínimo de 4 horas. La disolución diluida se pasó a través de un filtro de 5 µm y se concentró hasta una concentración de retentato diana de 2 g/l. La filtración de flujo tangencial se realizó usando membranas de celulosa regeneradas de 300K a través de 20 diavolúmenes con succinato 5 mM, pH 7. La exposición de membrana típica era de 1 gramo/ft2. El conjugado purificado se pasó a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 ºC-8 ºC.

Ejemplo 12: Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 usando el procedimiento de conjugación en un solo recipiente y complejo.

[0294] El presente ejemplo muestra que el intervalo preseleccionado de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede usarse para conjugación o bien en el procedimiento en un solo recipiente o bien en el procedimiento complejo. Los polisacáridos más grandes se producen inicialmente por las células bacterianas y el intervalo de peso molecular purificado resultante puede controlarse mediante el pH y el calor del procedimiento de hidrólisis en el ejemplo 9. En el presente ejemplo, se seleccionaron ocho lotes en los que el peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 oscilaba de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 140 kDa y se realizó la conjugación usando activación con triazol (CDT) en los procedimiento o bien en un solo recipiente o bien complejo que se describen anteriormente. Véase la tabla 19. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 1.125 kDa a 2.656 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM oscilaba de un número alto

de 22 a un bajo número de 15. El azúcar libre oscilaba de un alto número de un 23 % a un bajo número de un 11 %.

Tabla 19: Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados con polisacáridos capsulares de 90 kDa a 140 kDa.

Procedimiento	Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento de sac. (%)	Azúcar libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas
En un solo recipiente	1	142	93	11	1.932	19
	2	108	93	14	1.117	20
	3	142	85	17	1.609	15
	4	108	86	23	1.125	15
Complejo	1	121	63	11	2.130	19
	2	92	72	16	1.533	22
	3	119	74	14	2.656	15
	4	115	63	18	1.911	15

Ejemplo 13: Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 muestran constantemente protección en modelo de pielonefritis murino.

[0295] Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 se evaluaron para determinar su capacidad para proteger a ratones en un modelo de pielonefritis. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición a S. aureus i.p. se redujeron significativamente en comparación con controles inmunizados con PBS.

[0296] Los seis estudios individuales mostraron una reducción significativa en ufc/ml de riñones en los animales inmunizados (la figura 9). Cuando estos estudios se agruparon para metanálisis, la significación global para los estudios como un todo aumentó hasta por debajo de 0,0001. Los datos mostraron una reducción constante de la colonización de riñones trs vacunaciones activas con el polisacárido capsular conjugado.

Ejemplo 14: Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados mediante diferentes químicas de conjugación protejen a los ratones frente a infecciones experimentales.

[0297] Los estudios de inmunización activa en el modelo de pielonefritis murino se llevaron a cabo con conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados mediante química o bien de PDPH o bien de CDT. Los procedimientos para conjugar polisacáridos capsulares con CRM_{197} se describen anteriormente. Los resultados mostraron que ambos conjugados reducen la colonización en ratones en comparación con animales inmunizados sham (tabla 20).

Tabla 20: Efecto de la conjugación de PDPH frente a CDT sobre la protección frente a exposición a S. aureus en el modelo de pielonefritis.

Estudio Nº	Antígenos	Cepa/Dosis	logUFC/Riñón	Significa
Estudio 1	Solución salina + AlPO4	PFESA0266	5,53 ± 1,90	--
	1 mcg de CP5-CRM (PDPH) + AlPO4	2 x 108	3,01 ± 1,83	p < 0,001
	1 mcg de CP5-CRM (CDT) + AlPO4		1,67 ± 0,23	p < 0,000
Estudio 2	Solución salina + AlPO4	PFESA0266s	6,17 ± 1,76	--
	1 mcg de CP5-CRM (PDPH) + AlPO4	2,7 x 108	3,06 ± 1,69	p < 0,000
	1 mcg de CP5-CRM (CDT) + AlPO4		1,87 ± 0,69	p < 0,000

Ejemplo 15: La inmunización activa de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 protege a fatas en un modelo de endocarditis de rata.

[0298] Cuatro estudios se llevaron a cabo con conjugado de de PDPH CP5-CRM_{197}. Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 reducían significativamente las UFC recuperadas después de una exposición a PFESA0266 de S. aureus tanto en el corazón como los riñones en 2 de 3 experimentos (tabla 21). En el tercer estudio, el título anti-CP5 medio geométrico (TMG) fue el más bajo de los tres experimentos, pero sólo fue ligeramente más bajo que en el experimento previo.

Tabla 21: La inmunización con polisacárido capsular de serotipo 5-CRM_{197} reduce las UFC en un modelo de endocarditis de rata.

		Log UFC Recuperadas		**Significación**		**TMG**
Composición inmunogénica	**Cepa de exposición/Dosis**	**Corazón**	**Riñón**	**Corazón**	**Riñón**	**Título de CP**
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,34± 1,78	3,92 ± 1,73			103.000
1 mcg de PP5-CRM	2,21 x 10^8 ufc	7,94± 0,78	6,77 ± 0,79	p < 0,001	p < 0,05	
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,43± 2,30	3,11 ±			51.000

(47)

		Log UFC Recuperadas	Significación		TMG
Solución salina	6,5 x 10^7 ufc	5,63± 2,48	2,33 4,19 ± 2,05	No	No	
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,01± 2,49	3,90 ± 1,92			67.000
Solución salina	4,0 x 10^8 ufc	7,52± 1,38	6,52 ± 1,17	p < 0,0002	p < 0,0002	

Ejemplo 16: Inmunogenicidad potenciada de vacunas de conjugado de CP5 HMW en ratones en comparación con vacunas de conjugado de CP5 LMW

[0299] Se realizó un estudio de pielonefritis murina para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de diferentes formulaciones de conjugado de CP5. Se sometieron a prueba dos formulaciones: La primera formulación estaba compuesta por un CP5 de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 300 kDa) conjugado con CRM_{197}. La segunda formulación contenía un CP5 de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM_{197}. Se sometieron a prueba tres niveles de dosis para la vacuna de HMW (1, 0,1 y 0,01 mcg). La vacuna de LMW se sometió a prueba a 1 mcg. También estaba incluido un grupo de

control negativo compuesto por una vacuna de conjugado de polisacárido derivada de Streptococcus pneumoniae conjugado con CRM_{197} (PP5). Los polisacáridos se formularon con 22 mcg de AlPO4 en las semanas 0, 3 y 6 y se expusieron a PFESA0266 de S. aureus en la semana 8. Se extrajeron los riñones se y se contaron las colonias bacterianas 48 horas después de una exposición. Ambas vacunas fueron eficaces para generar una respuesta inmunitaria y se observó una reducción en las UFC de PFESA0266 de S. aureus en los riñones de ratones vacunados con los grupos de 1 µg grupos de vacuna tanto de HMW como de LMW. Esto dependiá de la dosificación tal como se muestra mediante la eficacia reducida con respecto a las dosificaciones de vacuna más bajas (figura 10). La lectura de UFC no era suficientemente sensible para detectar una diferencia en cuanto a la eficacia para las vacunas de HMW y de LMW. Los sueros de los ratones se sometieron a prueba por lo tanto mediante OPA. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 40 % de la cepa S. aureus PFESA0266 en un ensayo de OPA. Se observaron títulos aumentados de OPA para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (figura 11).

Ejemplo 17: Los conjugados de polisacárido de cápsula que comprenden polisacáridos de alto peso molecular muestran una inmunogenicidad aumentada en comparación con los conjugados que comprenden polisacáridos de bajo peso molecular.

[0300] Se llevaron a cabo estudios en primates no humanos (NHP) para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones de conjugado de cápsula. Se sometieron a prueba dos formulaciones a dos niveles de

dosificación diferentes (2 y 20 µg). La primera formulación contenía un polisacárido de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 130 kDa) conjugado con CRM_{197}. La segunda formulación contenía un polisacárido de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM_{197}. Se vacunaron grupos de cinco primates con una dosis individual de una u otra de vacuna y se monitorizaron los títulos inmunitarios antes de la vacunación y dos semanas después de la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 40 % de cepa S. aureus PFESA0266 en un esnayo de OPA. También se monitorizaron los títulos de anticuerpo mediante ELISA. Se observó una actividad aumentada para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (tabla 22), que se demuestra por un aumento de diez veces en los títulos de anticuerpo para la vacuna de HMW en comparación con la vacuna de LMW. La tasa de sujetos que responden a OPA para los NHP que recibieron la vacuna de HMW fue también más alta (un 80 % en comparación con un 40 %).

Tabla 22. Se observa inmunogenicidad aumentada para vacunas de conjugado de polisacárido de HMW en comparación con vacuna de conjugado de polisacárido de LMW.

	Nivel de dosis de CP5-CRM_{197} (mcg) por animal	**Media geométrica de PD1***	**Tasa de sujetos que responden a OPA (%)±**
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25	20	3	40

kDa)	2	8	40

* Aumento en veces calculado a partir del título de ELISA de CP5 2 semanas tras la vacunación en comparación con los títulos antes de la vacuna. ± Tasa de sujetos que responden calculada a partir de monos que generan un aumento en el título de OPA tras una dosis individual de vacuna 2 semanas tras la vacunación. Cada grupo contenía 5 macacos Rhesus y las vacunas se formularon con AlPO4 (250 mcg/dosis)

Ejemplo 18: La O-acetilación de polisacárido es importante para la inducción de respuestas de anticuerpos protectores frente a conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5.

[0301] Para evaluar la importancia de la O-acetilación de polisacárido capsular de serotipo 5, se O-desacetiló el polisacárido capsular nativo (dOAc) y conjugado con CRM_{197} (dOAc-CRM_{197}) usando química de conjugación de PDPH, tal como se analiza anteriormente. La eficacia de conjugado de dOAcCP-CRM_{197} se comparó junto con CP5-CRM_{197} en un modelo de pielonefritis murino.

[0302] La inmunización con conjugados carentes de grupos O-acetilo (dOAc CP5-CRM) no reducía las ufc bacterianas recuperadas en los riñones. Estos datos (tabla 23) indican que la O-acetilación es importante para obtener anticuerpos funcionales frente a CP5.

Tabla 23: La inmunización con Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 des-O-acetilados no protegía a los ratones frente a la conolización de riñón.

Estudio Nº	Antígenos	Cepa/Dosis	LogUFC/Riñón	Significación

		PFESA026		
Estudio 1	1 mcg de PP5-CRM	6	3,89 ± 2,24	
	1 mcg de dOAc CP5-CRM	7×10^8	4,20 ± 1,75	
	1 mcg de CP5-CRM		1,75 ± 0,39	valor p < 0,008
		PFESA026		
Estudio 2	Solución salina	6	5,08 ± 1,96	
	1 mcg de dOAc CP5-CRM	$2,4 \times 10^8$	5,89 ± 1,29	
	1 mcg de de CP5-CRM		2,93 ± 2,11	valor p < 0,02

Ejemplo 19: Confirmación de la importancia de la O-acetilación como epítopo funcional de polisacárido capsular de serotipo 5 mediante OPA usando anticuerpos monoclonales con especificidades conocidas.

[0303] Se evaluaron anticuerpos monoclonales frente a polisacárido capsular de serotipo 5 con especificidades para OAc + (CP5-7-1), OAc + /- (CP5-5-1) y OAc- (CP5-6-1) para determinar la actividad de destrucción de OP frente a la cepa PFESA0266 de tipo 5 (tabla 24). Se usaron anticuerpos monoclonales frente a polisacárido capsular de serotipo 8 (CP8-3-1 específico frenet a CP8 OAc+) como control negativo.

[0304] El AcM anti-CP5 especifico de OAc CP5-7-1 mediaba la destrucción de PFESA0266 de S. aureus (tabla 24). También el anticuerpo monoclonal CP5-5-1, que reconoce epítopos compartidos tanto por CP5 OAc + como por CP5 OAc-, mediaba la destrucción de la cepa PFESA0266. El anticuerpo

monoclonal específico para epítopos presentes en polisacárido capsular OAc- de serotipo 5 no mediaba la destrucción de la cepa PFESA0266. Estos resultados indican que son necearios epítopos de O-acetilo en el polisacárido capsular de serotipo 5 para provocar una actividad funcional de anticuerpos específicos de serotipo 5.

[0305] Los anticuerpos necesitan ser funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que supervisa la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

Tabla 24: Los anticuerpos monoclonales específicos frente a polisacárido capsular de serotipo 5 O-acetilado (+) y Polisacárido capsular de serotipo 5 O- y des-O-acetilado (+ /-) son opsónicos frente a PFESA0266 de S. aureus (tipo 5).

CP5-5-1 (O-Ac + /-) (mcg) 20 10 5 2,5				**CP5-6-1 (O-Ac -) (mcg) 20 10 5 2,5**				**CP5-7-1 (O-Ac +) (mcg) 20 10 5 2,5**				**CP8-3-1 (-control) (mcg) 20 10 5 2,5**			
28	33	30	21	-12	-12	-12	-12	31	46	49	55	-18	-13	-13	-13
				5	5	5	5					3	5	5	5

Datos notificados como porcentaje de destrucción y calculados determinando la razón del número de UFC que sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de UFC que sobrevivieron en pocillos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células HL-60.

Ejemplo 20: Se observa inmunogenicidad aumentada para conjugados de CP5 compuestos por polisacáridos de alto peso molecular en comparación con polisacáridos de bajo peso molecular en primates no humanos (NHP).

[0306] Se llevaron a cabo estudios en primates no humanos (NHP) para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones de conjugado de cápsula. Se sometieron a prueba dos formulaciones a dos niveles de dosificación diferentes (2 y 20 µg). La primera formulación estaba compuesta por un polisacárido de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 130 kDa) conjugado con CRM_{197}. La segunda formulación contenía un polisacárido de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM_{197}. Se vacunaron grupos de cinco primates con una dosis individual de una u otra vacuna y se monitorizaron los títulos inmunitarios antes de la vacunación y dos semanas tras la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 40 % de cepa S. aureus PFESA0266 en un ensayo de OPA. También se monitorizaron los títulos de anticuerpo mediante ELISA. Se observó una actividad aumentada para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (tabla 25). Hubo un aumento de tres a diez veces en los títulos de anticuerpo para la vacuna de HMW en comparación con la vacuna de LMW. La tasa de sujetos que responden a OPA para los NHP que recibieron la vacuna de HMW fue también más alta (un 80 % en comparación con un 40 %).

Tabla 25: Enhanced Inmunogenicidad se observa para HMW polisacárido conjugado vacunas en comparación con LMW polisacárido conjugado vacuna.

	Nivel de dosis de CP5-CRM_{197} (mcg) por animal	**Media geométrica de PD1***	**Tasa de sujetos que responden a OPA (%)±**
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

* Aumento en veces calculado a partir de título de ELISA de CP5 2 semanas tras la vacunación en comparación con títulos antes de la vacuna. ± Tasa de sujetos que responden calculada a partir de monos que generan un aumento en el título de OPA tras una dosis individual de vacuna 2 semanas tras la vacunación. Cada grupo contenía 5 macacos Rhesus y las vacunas se formularon con AlPO4 (250 mcg/dosis)

RESUMEN

[0307] Las dos químicas de conjugación, que se describen en el presente documento, producían un polisacárido capsular de serotipo 5 con enlace covalente con la proteína de portador CRM_{197}. No hubo diferencias significativas en sacárido libre, razón de polisacárido de serotipo 5-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

[0308] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora por referencia.

[0309] A pesar de que la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y de ejemplo para los fines de claridad de comprensión, pueden ponerse en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, en el que:

a) el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa.

2. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 1, en el que el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa.

3. Un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, en el que:

a) el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa.

4. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 3, en el que el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa.

5. El conjugado inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polisacárido tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa.

6. El conjugado inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el conjugado tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

7. El conjugado inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 10 y un 100 %

8. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 7, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 50 y un 100 %.

9. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 7, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 75 y un 100 %.

10. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el conjugado inmunogénico puede producir anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

11. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la proteína de portador es la CRM_{197}.

12. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 11, en el que la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos.

13. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 11 o 12, en el que la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1.

14. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 13, en el que al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar al menos en cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

15. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 13 o 14, en el que al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar en cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

16. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

17. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 16, en el que la CRM_{197} comprende de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

151

18. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende menos de un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

19. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 18, que comprende menos de un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

20. Una composición inmunogénica que comprende el conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

21. La composición inmunogénica de la reivindicación 20, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.

22. La composición inmunogénica de la reivindicación 21, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

23. La composición inmunogénica de la reivindicación 21, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.

24. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, que comprende menos de un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

25. La composición inmunogénica de la reivindicación 24, que comprende menos de un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

26. Un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria a un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o de serotipo 8 de Staphylococcus aureus en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25.

27. Un procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus aislado con carbonil-ditriazol (CDT) en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de serotipo 8 activado; y

b) hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 8 activado con una proteína de portador en un disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador;

en el que se produce un conjugado inmunogénico que comprende un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus-proteína de portador.

28. Un procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus aislado con carbonil-ditriazol (CDT) en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de serotipo 8 activado; y

b) hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 activado con una proteína de portador en un disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5-proteína de portador;

en el que se produce un conjugado inmunogénico que comprende un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus-proteína de portador.

29. El procedimiento de la reivindicación 27 o la reivindicación 28, que además comprende:

liofilizar el polisacárido aislado; y volver a suspender el polisacárido liofilizado en un disolvente orgánico.

30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que el polisacárido aislado activado se aísla con respecto a la reacción de activación antes de hacer que reaccione con la proteína de portador.

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que la etapa b) comprende:

i) liofilizar el polisacárido aislado activado aislado para producir un polisacárido aislado activado liofilizado;

ii) liofilizar la proteína de portador para producir una proteína de portador liofilizada; y

iii) volver a suspender el polisacárido aislado activado liofilizado y la proteína de portador liofilizada en un disolvente orgánico para producir un polisacárido aislado activado mezclado con una proteína de portador.

32. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, que además comprende la dilución de la mezcla de reacción de la etapa b) en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C.

33. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, que además comprende la dilución de la mezcla de reacción de la etapa b) en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

34. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, que además comprende aislar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo de S. aureus-proteína de portador.

35. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34, en el que el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar.

36. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA).

37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO).

38. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 y 29 a 37, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido con CDT comprende determinar el agua presente en el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus y ajustar la concentración de CDT a una razón molar de aproximadamente 1:1 de CDT:agua en el disolvente orgánico.

39. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 y 29 a 38, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido con CDT comprende determinar el agua presente en el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus y ajustar la concentración de CDT a una razón molar de aproximadamente 0,5:1 de CDT:agua en el disolvente orgánico.

40. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 y 29 a 38, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido con CDT comprende determinar el agua presente en el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus y ajustar la concentración de CDT a una razón molar de aproximadamente 0,75:1 de CDT:agua en el disolvente orgánico.

41. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 con CDT comprende proporcionar aproximadamente un exceso molar de 20 veces de CDT en comparación con el polisacárido.

42. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37 y 41, en el que el polisacárido de serotipo 5 CDT en una mezcla de disolvente orgánico se ajusta a una concentración acuosa de entre un 0,1 y un 0,3 %.

43. El procedimiento de la reivindicación 42, en el que la concentración acuosa se ajusta a un 0,2 %.

44. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 43, en el que la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo activado comprende una diafiltración.

45. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 44, en el que antes de la liofilización la proteína de portador se somete a diafiltración frente a NaCl y la razón en p/p de NaCl/proteína de portador de proteína se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5.

46. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45, en el que la proteína de portador es la CRM_{197}.

47. El procedimiento de la reivindicación 46, en el que se hace que reaccione el polisacárido de serotipo activado con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

48. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 47, en el que el polisacárido capsular de serotipo de S. aureus aislado se mezcla con imidazol o triazol antes del mezclado con CDT en un disolvente orgánico.

49. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 48, que además comprende hidrolizar el conjugado de polisacárido de serotipo-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar.

50. Un procedimiento de fabricación de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus con 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH) y una carbodiimida en un disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH;

b) hacer que reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado;

c) aislar el polisacárido de serotipo 8 activado para producir un polisacárido de serotipo 8 activado aislado;

d) proporcionar una proteína de portador activada;

e) hacer que reaccione el polisacárido aislado de serotipo 8 activado con la proteína de portador activada para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

51. Un procedimiento de fabricación de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus con 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH) y una carbodiimida en un disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH;

b) hacer que reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado;

c) aislar el polisacárido de serotipo 5 activado para producir un polisacárido de serotipo 5 activado aislado;

d) proporcionar una proteína de portador activada;

e) hacer que reaccione el polisacárido aislado de serotipo 5 activado con la proteína de portador activada para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5-proteína de portador; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

52. El procedimiento de la reivindicación 50 o la reivindicación 51, en el que la proteína de portador activada se aísla antes de hacer que reaccione la proteína de portador activada con el polisacárido activado.

53. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 52, en el que:
la etapa c) además comprende liofilizar el polisacárido aislado de serotipo 8 activado para producir un polisacárido de serotipo activado liofilizado.

54. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, en el que el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar.

55. El procedimiento de la reivindicación 54, en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA).

56. El procedimiento de la reivindicación 55, en el que el disolvente aprótico polar es dimetilsulfóxido (DMSO).

57. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 56, en el que la carbodiimida es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC).

58. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 57, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo con

PDPH y EDAC en un disolvente orgánico comprende mantener una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de aproximadamente 1:5:3.

59. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 58, en el que el agente reductor es ditiotreitol (DTT).

60. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 59, en el que la activación de la proteína de portador comprende hacer que reaccione la proteína de portador con un ácido bromoacético.

61. El procedimiento de la reivindicación 60, en el que el ácido bromoacético comprende el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS).

62. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 61, en el que la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo activado comprende una diafiltración.

63. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 62, en el que la etapa de aislamiento de la proteína de portador activada comprende una diafiltración.

64. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 63, que además incluye la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de

serotipo-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar.

65. El procedimiento de la reivindicación 64, en el que la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo-proteína de portador comprende la adición de clorhidrato de cisteamina.

66. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 65 que además comprende aislar el conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

67. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que el aislamiento del polisacárido de serotipo-proteína de portador conjugado comprende una diafiltración.

68. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 67, en el que dicha proteína de portador es la CRM_{197}.

69. El procedimiento de la reivindicación 68, en el que se hace que reaccione el polisacárido de serotipo activado con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

70. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 69, en el que el polisacárido activado tiene un tamaño de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 1.000 kDa.

71. El procedimiento de la reivindicación 70, en el que el polisacárido activado tiene un tamaño de entre aproximadamente 50 kDa y 500 kDa.

72. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 71, en el que el conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico tiene un tamaño de entre 400 kDa y aproximadamente 5.000 kDa.

73. Un conjugado inmunogénico que se produce mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 72.

74. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 73, que comprende más de aproximadamente un 1 % de polisacárido libre y menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre.

75. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 73, que comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre.

76. Una composición inmunogénica que comprende el conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 73 a 75 y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

77. La composición inmunogénica de la reivindicación 76, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.

78. La composición inmunogénica de la reivindicación 77, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

79. La composición inmunogénica de la reivindicación 78, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.

80. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, que comprende menos de un 30 % de tipo polisacárido libre en comparación con la cantidad total de tipo polisacárido.

81. La composición inmunogénica de la reivindicación 80, que comprende menos de un 20 % de tipo polisacárido libre en comparación con la cantidad total de tipo polisacárido.

82. Un polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus que tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa unido covalentemente a una proteína de portador; en el que el peso molecular combinado del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador es de entre aproximadamente 200 kDa y 5.000 kDa.

83. Un polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus que tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa unido covalentemente a una proteína de portador; en el que el peso molecular combinado del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador es de entre aproximadamente 200 kDa y 5.000 kDa.

84. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 82 o la reivindicación 83, en el que el polisacárido tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa.

85. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 82 o la reivindicación 83, que tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

86. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 82 o la reivindicación 83, en el que la proteína de portador es la CRM_{197}.

87. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 86, en el que la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos.

88. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 86 o la reivindicación 87, en el que la razón molar de lisinas

conjugadas con respecto a CRM_{197} es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1.

89. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de una cualquiera de la reivindicación 88, en el que al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar al menos en cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

90. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 88 o la reivindicación 89, en el que al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar en cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

91. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de cualquiera de las reivindicaciones 88 a 89, en el que la CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

92. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 91, en el que la CRM_{197} comprende de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

93. Una composición inmunogénica que comprende el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de cualquiera de las reivindicaciones 82 a 92 y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

94. La composición inmunogénica de la reivindicación 93, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aiuminio.

95. La composición inmunogénica de la reivindicación 94, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

96. La composición inmunogénica de la reivindicación 95, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.

97. Un procedimiento de reducción o de prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una bacteria de estafilococo en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 y 76 a 81 y 93 a 96 al sujeto.

98. El procedimiento de la reivindicación 97, en el que la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en Staphylococcus aureus invasivo, septicemia y estado de portador.

99. Un procedimiento de reducción o de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de cualquiera

de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 y 76 a 81 y 93 a 96 al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

100. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 97 a 99, en el que el sujeto es un ser humano, una mascota doméstica, o un animal de ganado.

101. Un procedimiento de aislamiento de un polisacárido capsular de S. aureus con un peso molecular de 20 a 1.000 kDa que comprende la etapa de someter una célula bacteriana suspensión a un tratamiento de calor ácido.

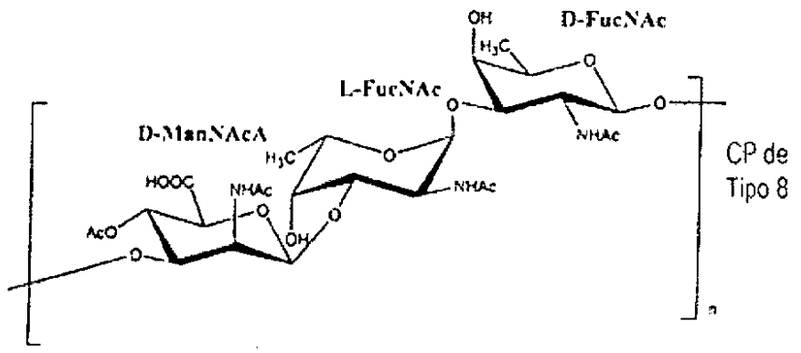
102. Un anticuerpo generado mediante un polisacárido capsular, un conjugado inmunogénico, o una composición inmunogénica de la presente invención.

103. El anticuerpo de la reivindicación 102, en el que el anticuerpo es funcional tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

RESUMEN

[0310] La presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8 de S. aureus conjugados con proteínas portadoras y procedimientos para su preparación y uso. Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica o bien 1,1-carboil-di-1,2,4-triazol (CDT) o bien 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH).

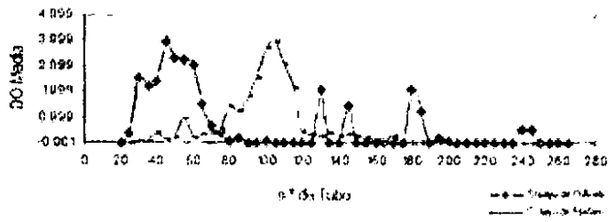
FIGURA 1



[-3)-β-D-ManNAcA(4-O-Ac)-(1-3)-α-L-FucNAc-(1-3)-α-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURA 2

A.


4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
-0.001
DO (leds)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280

B.

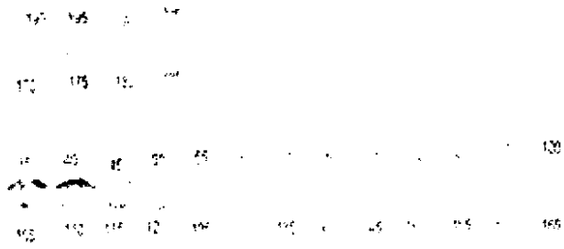
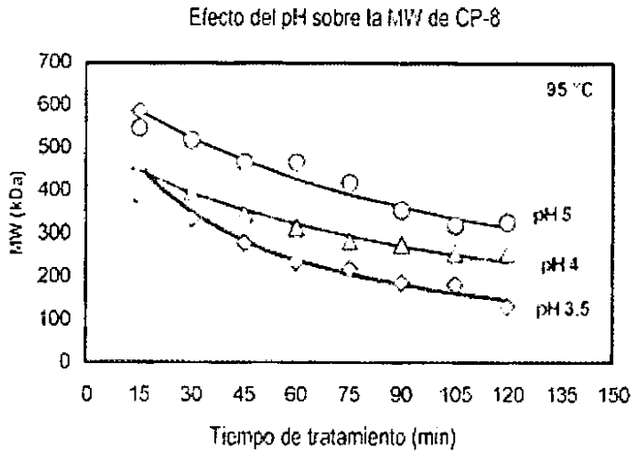


FIGURA 3

A.


Efecto del pH sobre la MW de CP-8
95 °C
pH 5
pH 4
pH 3.5
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Tiempo de tratamiento (min)

B.

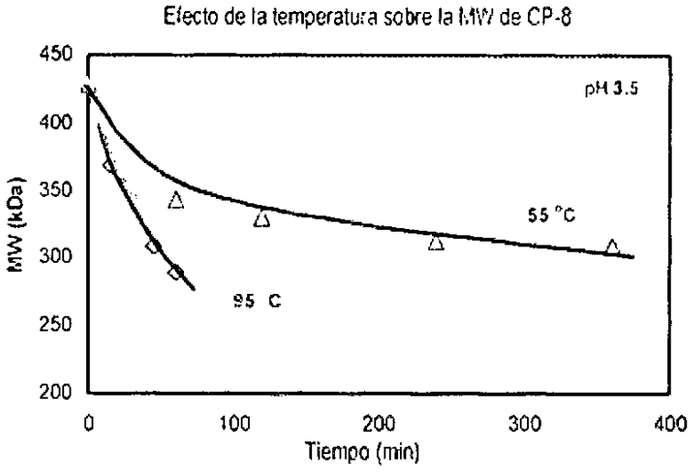

Efecto de la temperatura sobre la MW de CP-8
pH 3.5
55 °C
95 C
MW (kDa)
450
400
350
300
250
200
0 100 200 300 400
Tiempo (min)

FIGURA 4

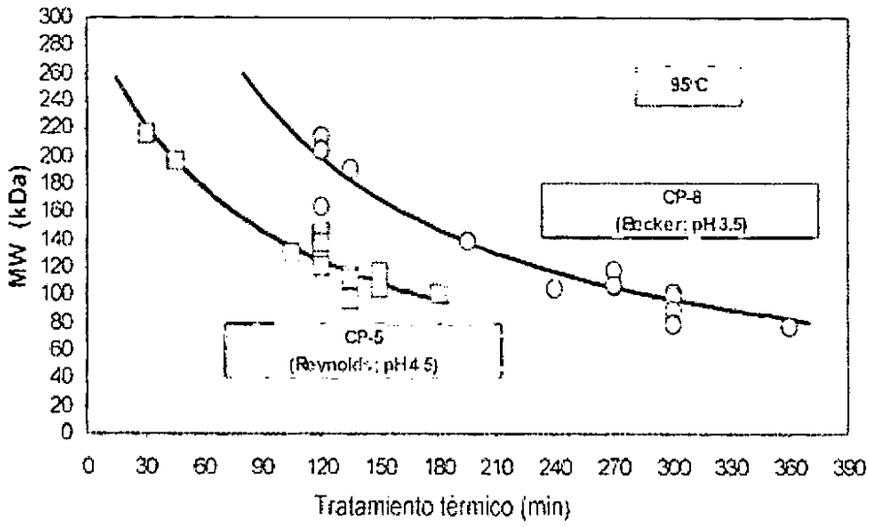

MW (kDa)
300
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
390
Tratamiento térmico (min)
95°C
CP-8
(Becker; pH 3.5)
CP-5
(Reynolds; pH 4.5)

FIGURA 5

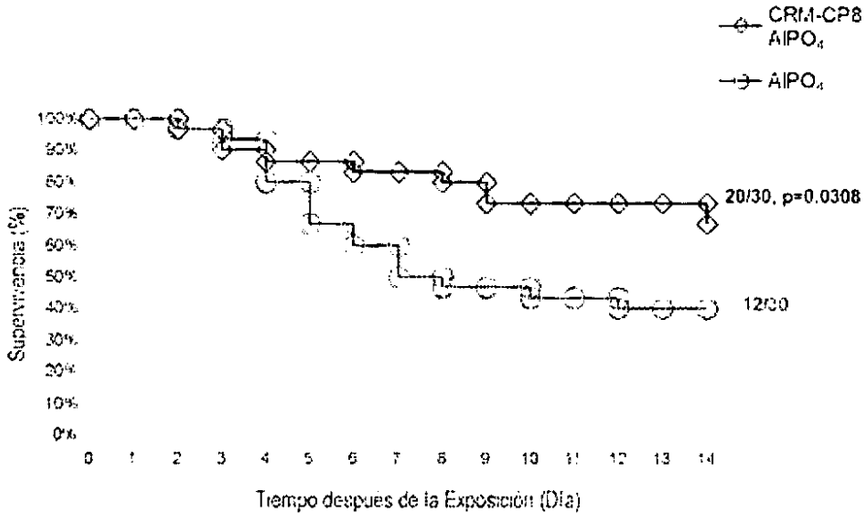
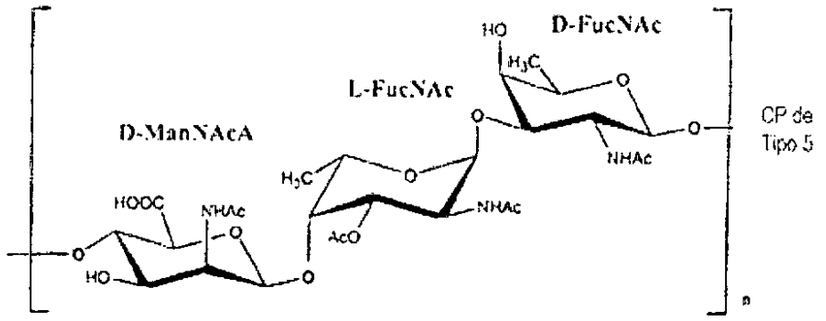

CRM-CP8 AlPO4
AlPO4
20/30, p=0.0308
12/30
Supervivencia (%)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Tiempo despues de la Exposición (Día)

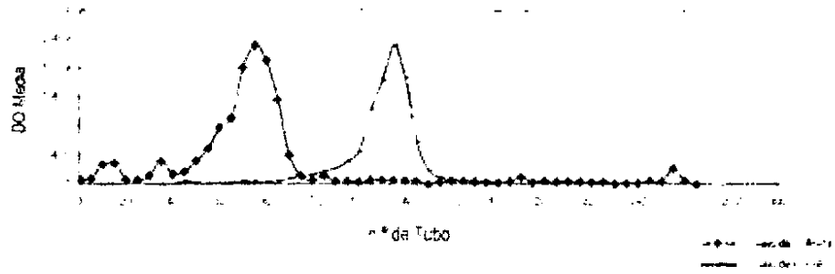
FIGURA 6



[-4)-β-D-ManNAcA-(1-4)-α-L-FucNAc(3-O-Ac)-(1-3)-β-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURA 7

A.



B.

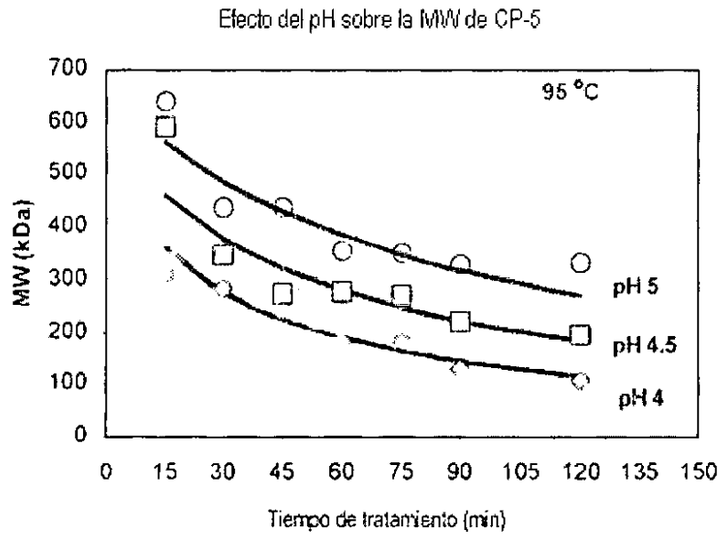
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130

135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195

FIGURA 8

A.


Efecto del pH sobre la MW de CP-5
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
95 °C
pH 5
pH 4.5
pH 4
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Tiempo de tratamiento (min)

B.

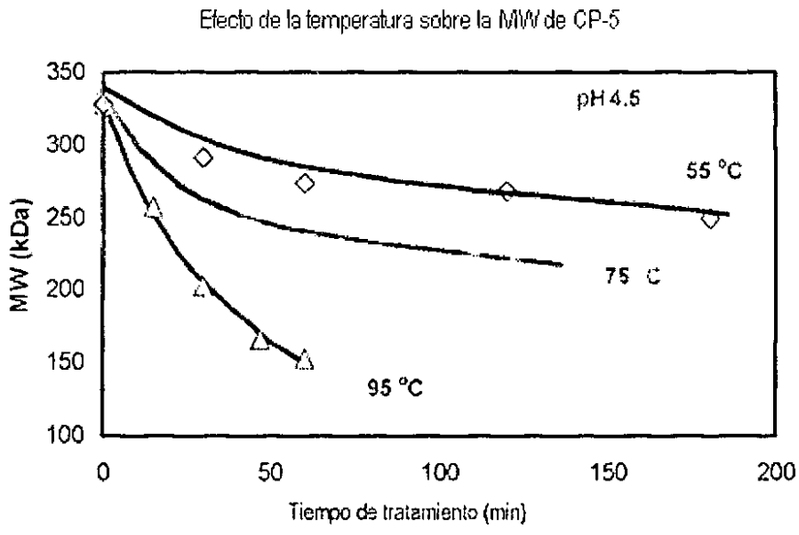
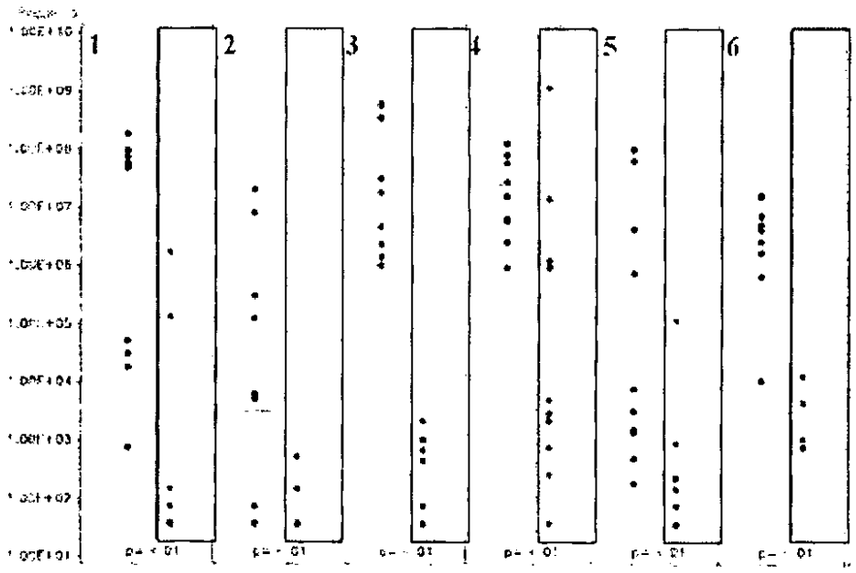

Efecto de la temperatura sobre la MW de CP-5
MW (kDa)
350
300
250
200
150
100
pH 4.5
55 °C
75 °C
95 °C
0 50 100 150 200
Tiempo de tratamiento (min)

FIGURA 9



Metanálisis p =< 0.0001

El área sombreada es el grupo inmunizado con conjugado de polisacárido de serotipo 5

FIGURA 10

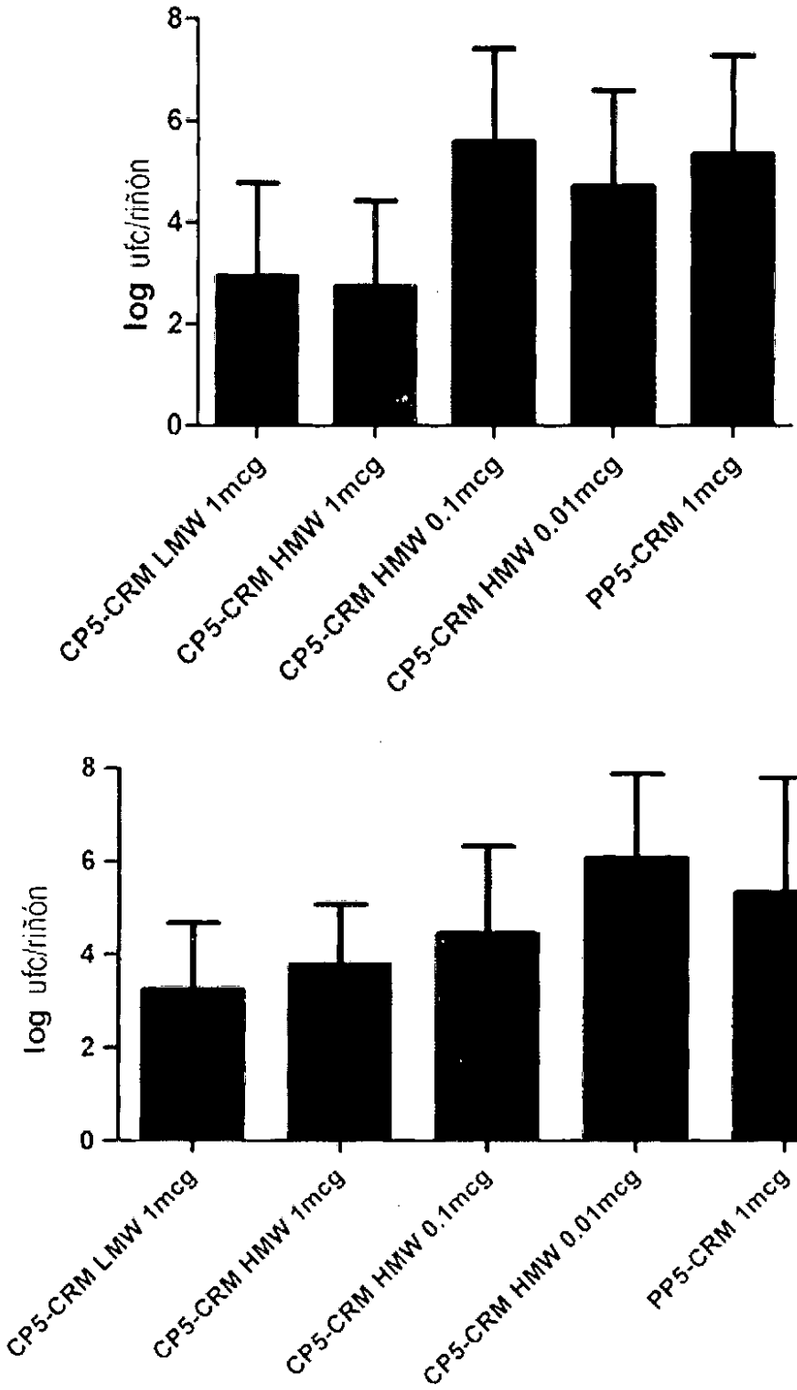
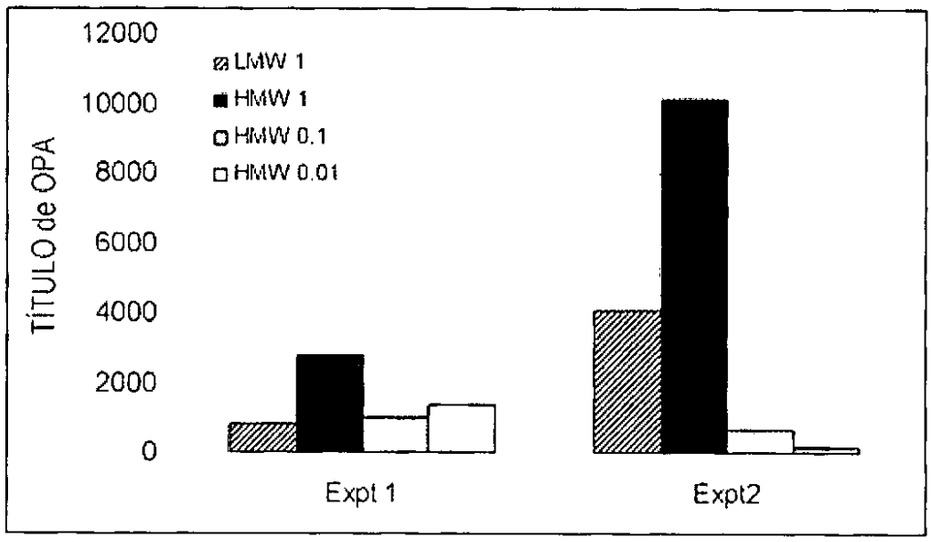

log ufc/riñón
0
2
4
6
8
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg
log ufc/riñón
0
2
4
6
8
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg

FIGURA 11


12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
TÍTULO de OPA
LMW 1
HMW 1
HMW 0.1
HMW 0.01
Expt 1
Expt2

000COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE CONJUGADO DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 5 Y 8 DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Referencia cruzada a las Solicitudes Relacionadas

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de las Solicitudes de Patente Provisional de los Estados Unidos con n.ºs 61/219.143 y 61/219.151, presentadas el 22 de junio de 2009, la totalidad de cada una de las divulgaciones de las cuales se incorporan por la presente que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

Campo de la invención

[0001] La invención se refiere en general a composiciones inmunogénicas de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 y 8 de Staphylococcus aureus y procedimientos para su preparación y uso.

Antecedentes de la invención

[0002] Los seres humanos son un depósito natural para Staphylococcus aureus Gram positivas. Por ejemplo, S. aureus puede colonizar la piel, las fosas nasales y garganta, o bien permanentemente o bien de forma transitoria, sin dar lugar a enfermedad. Las infecciones por S. aureus varían entre infecciones de la piel leves y endocarditis, osteomielitis, bacteriemia y septicemia. S. aureus también da lugar a una mayoría de infecciones nosocomiales, y su prevalencia en infecciones de aparición en la comunidad va en aumento. Además, en 2005, las infecciones por S. aureus resistentes a meticilina (MRSA) se estimaron en 31,8 por 100.000 individuos, incluyendo 16.650 muertes en los Estados Unidos en 2005 (Klevens y col. (2007) J. Am. Med. Assoc. 298:1763 a 1771). Posteriormente tiene lugar la enfermedad

166

cuando los individuos están immunocomprometidos debido a brechas en las barreras inmunitarias, tal como durante la cirugía, colocación de catéteres permanentes u otros dispositivos, traumatismo o heridas.

[0003] S. aureus produce un gran número de antígenos extra- y intracelulares, incluyendo numerosas toxinas y enzimas. De particular interés en el presente documento son los serotipos de polisacárido capsular de S. aureus (véase el documento de Karakawa & Vann, "*Capsular polysaccharides of Staphylococcus aureus*", en: Weinstein & Fields, eds. *Seminars in Infectious Diseases*. IV. Bacterial Vaccines. (Nueva York, NY; Thieme Stratton; 1982. págs. 285 a 293), especialmente polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8. Estudios epidemiológicos sobre un gran número de cepas de S. aureus aisladas a partir de individuos mostraron que de un 70 % a un 80 % fueron o bien polisacárido capsular de serotipo 5 o bien 8 (Arbeit y col. (1984) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:85 a 91). Desafortunadamente, los polisacáridos capsulares son pobres inmunógenos por sí mismos.

[0004] Las infecciones y enfermedades por estafilococos aumentaron dramáticamente en los últimos veinte años, tal como lo ha hecho el uso de dispositivos intravasculares y de procedimientos invasivos. El aumento en incidencia de enfermedad es más preocupante debido a un aumento paralelo de resistencia a antibióticos; por lo tanto, hay una necesidad urgente de composiciones inmunogénicas para evitar infecciones y enfermedades por estafilococos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0005] La presente invención se dirige hacia conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, y a procedimientos para fabricar tales conjugados. Los polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de S. aureus pueden obtenerse directamente a partir de las bacterias usando unos procedimientos de aislamiento conocidos por los expertos en la técnica, pueden producirse usando protocolos de síntesis, o pueden producirse de forma recombinante usando unos procedimientos de ingeniería genética también conocidos por los expertos en la técnica. Además, la presente invención proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria frente a una bacteria de estafilococo, procedimientos para prevenir una enfermedad causada por una bacteria de estafilococo, y procedimientos para reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad causada por infección con una bacteria de estafilococo.

[0006] En una realización, la invención comprende un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, en el que el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa. En algunas realizaciones, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa. En una realización, la parte de polisacárido del conjugado inmunogénico tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

[0007] En una realización, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 tiene un grado de O-acetilación de entre un 10 y un 100 %. En una realización, el grado de O-acetilación es de entre un 50 y un 100 %. En una realización, el grado de O-acetilación es de entre un 75 y un 100 %. En una realización, el conjugado inmunogénico genera un anticuerpo que es funcional tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0008] En una realización, la proteína de portador de conjugado inmunogénico comprende CRM_{197}. En una realización, la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos. En una realización, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1. En una realización, el conjugado comprende un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido para al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, el enlace entre la proteína de portador y el polisacárido tiene lugar en una de cada 5 unidades de repetición del polisacárido.

[0009] En una realización, el conjugado inmunogénico que comprende CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas o de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En una realización, el conjugado inmunogénico que comprende CRM_{197} comprende de 5 a 23 lisinas o de 8 a 12 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

[0010] En una realización, el conjugado inmunogénico comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 que es 10 a 100 % O-Acetilado. En una realización, el conjugado inmunogénico comprende un polisacárido de tipo 5

u 8 que es 50 a 100 % O-Acetilado. En una realización, el conjugado inmunogénico comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 que es 75 a 100 % O-Acetilado. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica puede usarse para generar unos anticuerpos que son funcionales en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0011] En una realización, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0012] En una realización, el conjugado inmunogénico comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0013] En una realización, la invención comprende una composición inmunogénica que comprende un conjugado inmunogénico tal como se describe en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

[0014] El adyuvante puede ser un adyuvante basado en aluminio, tal como uno o más de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, el adyuvante comprende fosfato de aluminio.

[0015] En una realización, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0016] En una realización, la composición inmunogénica comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

[0017] En una realización, la invención comprende un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria a un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus conjugado en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento.

[0018] En una realización, la invención comprende un procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus aislado con 1,1-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT) en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de serotipo 5 u 8 activado; y hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado con una proteína de portador en un disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador.

[0019] En una realización, el procedimiento de activación de polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus además comprende liofilizar el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado y volver a suspender el polisacárido liofilizado en un disolvente orgánico. En una realización, el polisacárido resuspendido se activa y a continuación se hace que reaccione directamente con la proteína de portador. En una realización, el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado se aísla antes de hacer que reaccione con la proteína de portador. En una realización, el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado aislado se liofiliza para producir un polisacárido de serotipo

5 u 8 aislado activado liofilizado antes de hacer que reaccione el polisacárido con la proteína de portador. En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína de portador comprende una etapa de liofilización de la proteína de portador para producir una proteína de portador liofilizada antes de hacer que reaccione la proteína de portador con el polisacárido. En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína de portador comprende la etapa de volver a suspender el polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado liofilizado y la proteína de portador liofilizada en un disolvente orgánico como parte de la reacción del polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado activado con una proteína de portador.

[0020] En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de dilución de la mezcla de reacción de polisacárido activado y proteína de portador y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C.

[0021] En una realización, la mezcla de reacción de activado polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus y proteína de portador se mantiene a un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

[0022] En una realización, el procedimiento de producción de un polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo 5 u 8 aislado-proteína conjugado después de que éste se produce.

[0023] En una realización, el disolvente orgánico que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador es un disolvente aprótico polar. En una realización, el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido aislado-proteína de portador el disolvente orgánico es DMSO.

[0024] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de ajustar la concentración acuosa de la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 5 y CDT en un disolvente orgánico a entre aproximadamente un 0,1 y un 0,3 %. En una realización, la concentración acuosa de la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 5 y CDT en un disolvente orgánico se ajusta a aproximadamente un 0,2 %.

[0025] En una realización, la etapa de activación de polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus aislado comprende hacer que reaccione el polisacárido con aproximadamente una cantidad de CDT que tiene un exceso molar de 20 con respecto a la cantidad de polisacárido presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 5 y CDT en un disolvente orgánico.

[0026] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de determinación de la concentración acuosa de la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8. En una

realización, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se prevé en aproximadamente una cantidad de CDT que es equimolar con respecto a la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico.

[0027] En una realización, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se prevé en aproximadamente una cantidad de CDT que tiene una razón molar de aproximadamente 0,5:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico. En una realización, la cantidad de CDT que se añade a la mezcla de reacción para activar el polisacárido se prevé en aproximadamente una cantidad de CDT que tiene una razón molar de 0,75:1 en comparación con la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción que comprende polisacárido capsular de tipo 8 y CDT en un disolvente orgánico.

[0028] En una realización, el procedimiento que comprende la etapa de aislamiento del polisacárido activado comprende la etapa de diafiltración.

[0029] En una realización, el procedimiento que comprende la liofilización de la proteína de portador, antes de la liofilización la proteína de portador se somete a diafiltración frente a NaCl y la razón en p/p de NaCl/proteína de portador de proteína se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5. En una realización, la razón de NaCl con respecto a proteína de portador es de aproximadamente 1.

170

[0030] En una realización, la proteína de portador que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende CRM_{197}.

[0031] En una realización, se hace que la CRM_{197} que se usa en el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador reaccione con el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

[0032] En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de mezclado del polisacárido capsular de tipo 5 u 8 con imidazol o triazol antes del mezclado con CDT en un disolvente orgánico.

[0033] En una realización, el procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de S. aureus aislado-proteína de portador comprende la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar.

[0034] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH) y una carbodiimida en un disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH; hacer que

reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado; aislar el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado para producir un polisacárido de serotipo 5 u 8 activado aislado; proporcionar una proteína de portador activada; hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado aislado con la proteína de portador activada para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador. En una realización, la proteína de portador activada se aísla antes de hacer que reaccione la proteína de portador activada con el polisacárido activado.

[0035] En una realización, la etapa de aislamiento de la proteína de portador activada además comprende liofilizar el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado aislado para producir un polisacárido de serotipo 5 u 8 activado liofilizado.

[0036] En una realización, el ácido bromoacético es un éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS).

[0037] En una realización, el procedimiento de producción de polisacárido capsular de serotipo 8-proteína de portador conjugado que utiliza PDPH comprende el uso de un disolvente orgánico que es un disolvente aprótico polar. En una realización, el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA), En una realización, el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO).

(21)

[0038] En una realización, la carbodiimida que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC).

[0039] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende la etapa de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 con PDPH y EDAC en un medio orgánico en una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de aproximadamente 1:5:3.

[0040] En una realización, el agente reductor que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC es ditiotreitol (DTT).

[0041] En una realización, la activación de la proteína de portador en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende hacer que reaccione la proteína de portador con un ácido bromoacético.

[0042] En una realización, la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo 5 u 8 activado en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende una diafiltración.

[0043] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar. En una realización, la etapa de hidrolización del

conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende la adición de clorhidrato de cisteamina.

[0044] En una realización, el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC además comprende aislar el conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

[0045] En una realización, el aislamiento del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende una diafiltración.

[0046] En una realización, la proteína de portador que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC comprende CRM_{197}.

[0047] En una realización, la CRM_{197} en el procedimiento de producción de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-CRM_{197} conjugado que utiliza PDPH y EDAC se añade en una razón en peso de aproximadamente 1:1 de CRM_{197}:molécula de polisacárido capsular.

[0048] En una realización, el polisacárido capsular de tipo 5 u 8 activado que se usa en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC tiene un tamaño de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 500 kDa.

[0049] En una realización, el conjugado inmunogénico que se produce en el procedimiento de producción de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que utiliza PDPH y EDAC tiene un

tamaño de entre aproximadamente entre 400 kDa y aproximadamente 5.000 kDa.

[0050] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 o 8-proteína de portador que se produce mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento.

[0051] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 o 8-proteína de portador que se produce mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente o portador. En una realización, las composiciones inmunogénicas comprenden un adyuvante basado en aluminio que puede seleccionarse del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento comprenden el adyuvante de fosfato de aluminio.

[0052] Las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento pueden comprender menos de un 30 % y menos de un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8. Las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento pueden almacenarse en agua o en un tampón de pH neutro de baja fuerza iónica.

[0053] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de reducción o de prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una bacteria de estafilococo en un sujeto,

comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma terapéutica o profiláctica de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento al sujeto. En una realización, la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en Staphylococcus aureus invasivo, septicemia y estado de portador.

[0054] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de reducción o de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma profiláctica de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

[0055] En una realización, el procedimiento de la invención comprende la sustitución de CDT por CDI.

[0056] En una realización, la invención proporciona un polisacárido capsular de tipo 5 u 8 de Staphylococcus aureus que tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 800 kDa unido covalentemente a una proteína de portador; en el que el peso molecular combinado del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador es de entre aproximadamente 400 kDa y 5.000 kDa.

[0057] En una realización, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende una parte de polisacárido que tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa. En una realización, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

193

[0058] En una realización, la parte de proteína de portador del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende CRM_{197}. En una realización, la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos. En algunas realizaciones, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1. En algunas realizaciones, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende al menos un enlace covalente entre CRM_{197} al menos en cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador comprende al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido que tiene lugar en cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la CRM_{197} comprende de 5 a 23 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de comprende de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de comprende de 8 a 12 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

[0059] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 de S. aureus

unido covalentemente a la proteína de portador tal como se describe en el presente documento y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

[0060] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de administración de una composición inmunogénica que comprende un polisacárido de tipo 5 u 8 de S. aureus unido covalentemente a la proteína de portador tal como se describe en el presente documento a un sujeto para generar una respuesta inmunitaria tal como se describe en el presente documento.

[0061] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de aislamiento de un polisacárido con un peso molecular entre 20 kDa y 1.000 kDa.

[0062] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo generado mediante un polisacárido capsular, un conjugado inmunogénico, o una composición inmunogénica de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0063] La presente invención se entenderá mejor y características, aspectos y ventajas diferentes de las que se exponen anteriormente se harán evidentes cuando se tengan en cuenta la siguiente descripción detallada de la misma. Tal descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en los que:

[0064] La figura 1 muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus (ácido N-acetil mannosaminurónico es ManNAca, N-acetil L-fucosamina es L-FucNAc, y N-acetil D-fucosamina es D-FucNAc).

[0065] La figura 2A muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus (ensayo de O-Acetilo) y ácido teicoico (ensayo de fosfato); la figura 2B muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus mediante ensayo de inmunodifusión doble.

[0066] La figura 3A muestra el efecto de pH (3,5, 4 o 5) a 95 °C tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus en un tratamiento térmico; la figura 3B muestra el efecto de la temperatura (55 °C, 75 °C o 95 °C) a un pH de 3,5 tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus en un tratamiento térmico.

[0067] La figura 4 muestra el peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus purificado en comparación con polisacárido capsular de serotipo 5 a lo largo del tiempo durante el tratamiento térmico a un pH de 3,5 y 4,5, respectivamente, y 95 °C.

[0068] La figura 5 muestra un aumento de la supervivencia en ratones que recibieron un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} (diamantes) en comparación con controles tratados con AlPO4 (círculos).

[0069] La figura 6 muestra una estructura de polisacárido de repetición de polisacárido de serotipo 5 de S. aureus (ácido N-acetil mannosaminurónico es ManNAcA, N-acetil L-fucosamina es L-FucNAc, y N-acetil D-fucosamina es D-FucNAcA).

[0070] La figura 7A muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido de serotipo 5 de S. aureus (ensayo de O-Acetilo) y ácido teicoico (ensayo de fosfato); la figura 7B muestra un análisis de fracciones a partir de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) para polisacárido de serotipo 5 de S. aureus mediante ensayo de inmunodifusión doble.

[0071] La figura 8A muestra el efecto de pH (3,5, 4 o 5) a 95 °C tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus en un tratamiento térmico; la figura 8B muestra el efecto de la temperatura (55 °C, 75 °C o 95 °C) a un pH de 3,5 tras la reducción de peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus en un tratamiento térmico.

[0072] La figura 9 muestra una reducción de pielonefritis en ratones que recibieron un polisacárido de serotipo 5-CRM_{197} conjugado en comparación con unos controles tratados con PBS (el área sombreada son los ratones tratados).

[0073] La figura 10 muestra unidades de formación de colonias (UFC) recuperadas en riñones después de una exposición a PFESA0266 de S. aureus en ratones vacunados con CP5-CRM de alto peso molecular (HMW), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW) o control de PP5-CRM

[0074] La figura 11 muestra una comparación de títulos de OPA (media geométrica) a partir de suero que se obtiene a partir de ratones vacunados con diferentes formulaciones de polisacárido conjugado (CP5-CRM de alto peso molecular (HMW), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW)). Los grupos consistieron en de 5 a 9 ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Visión de conjunto

[0075] La presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con proteínas portadoras y procedimientos para su preparación y uso. Características novedosas de los conjugados inmunogénicos de la invención incluyen los perfiles de peso molecular de los polisacáridos y de los conjugados resultantes, la razón de lisinas conjugadas por proteína de portador de CRM_{197} y el número de lisinas con enlace covalente con el polisacárido, el número de enlaces covalentes entre la proteína de portador y el polisacárido como una función de las unidades de repetición del polisacárido, y la cantidad relativa de polisacárido libre en comparación con el polisacárido total. La expresión "polisacárido libre" tal como se usa en el presente documento quiere decir un polisacárido que no está conjugado con la proteína de portador, pero que está, no obstante, presente en la composición de conjugado.

[0076] Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol), CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida). CDI es específico sólo para la conjugación de CP8. El uso de CDI/CDT da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador, mientras que el uso de PDPH da como resultado un enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

[0077] Agentes reticulantes adicionales para enlaces de -SH (CP tiolado) a -NH2 incluyen pero no se limitan a: sulfo-LC-SMPT; sulfo-LC-SMPT (4-sulfosuccinimidil-6-metil-a-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato)); sulfo-KMUS (éster de N-[k-maleimidoundecanoiloxi]sulfosuccinimida); sulfo-LC-SPDP (6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo) que se escinde por tioles; sulfo-SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo); sulfo-SIAB (N-sulfosuccinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato); sulfo-EMCS ([éster de N-e-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida); EMCA (ácido N-e-maleimidocaproico); sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo); sulfo-MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida); sulfo-GMBS (éster de N-[g-maleimidobutyriloxi]sulfosuccinimida); BMPA (ácido N-β-maleimidopropiónico); clorhidrato de 2-inmunotiolano; éster N-succinimidilíco del ácido 3-(2-piridilditio) propiónico; éster N-succinimidilíco del ácido 3-malemidopropiónico; éster N-succinimidilíco del ácido 4-maleimidobutírico; SMPT (4-succinimidiloxicarbonil-metil-a-[2-piridilditio]tolueno); LC-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxi-[6-amidocaproato] de succinimidilo); KMUA (ácido N-k-maleimidoundecanoico); LC-SPDP (6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo); SMPH (6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato de succinimidilo); SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo); SIAB (N-succinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato); EMCS (éster de [N-e-maleimidocaproiloxi]succinimida); SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo); MBS (éster m-maleimidobenzoílico de N-

hidroxisuccinimida); SBAP (3-[bromoacetamido]propionato de succinimidilo); BMPS (éster de N-[β-maleimidopropiloxi]succinimida); AMAS (éster de N-(a-maleimidoacetoxi) succinimida); SIA (yodoacetato de N-succinimidilo); y N-succinimidil (4-yodoacetil)-aminobenzoato.

[0078] Los agentes pueden también reticularse usando agentes reticulantes para grupos -SH a -OH. Tales agentes reticulantes incluyen pero no se limitan a PMPI (N-[p-maleimidofenil]isocianato).

[0079] Las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento son útiles en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, los conjugados pueden usarse en la producción de composiciones inmunogénicas de conjugado para proteger a los receptores frente a infecciones por S. aureus. Alternativamente, los varios conjugados pueden usarse en la producción de anticuerpos frente a polisacáridos capsulares bacterianos, que posteriormente pueden usarse en investigación y en ensayos clínicos de laboratorio, tal como serotipado y detección bacteriana. Tales anticuerpos pueden usarse también para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos que se producen frente a polisacáridos bacterianos son funcionales o bien en un modelo de eficacia animal o bien en un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0080] A menos que se defina de otro modo, todas las expresiones técnicas y científicas que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la técnica a la que se refiere la invención. A pesar de que cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento pueden usarse en la práctica o realización de pruebas de la

presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen en el presente documento. En la descripción de las realizaciones y reivindicaciones de la invención, cierta terminología se usará de acuerdo con las definiciones que se exponen a continuación.

[0081] Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento y/o que se harán evidentes para un experto en la técnica tras la lectura de la presente divulgación, etcétera.

[0082] Tal como se usa en el presente documento, "aproximadamente" quiere decir dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor tal como un intervalo de concentraciones, marco de tiempo, peso molecular, temperatura o pH indicados. Un intervalo de este tipo puede estar dentro de un orden de magnitud, habitualmente dentro de un 20 %, más habitualmente aún dentro de un 10 %, y incluso más habitualmente dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado. La variación admisible abarcada por la expresión "aproximadamente" dependerá del sistema particular sometido a estudio, y puede apreciarse fácilmente por un experto en la técnica. Siempre que se menciona un intervalo dentro de la presente solicitud, cada número entero en su totalidad dentro del intervalo se contempla también como una realización de la invención.

[0083] Se observa que en la presente divulgación, expresiones tales como "comprende", "comprendido/a", "comprendiendo/ que comprende", "contiene", "conteniendo/ que contiene" y similares pueden tener el

147

significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos; por ejemplo, éstas pueden significar "incluye", "incluído/a", "incluyendo/ que incluye" y similares. Tales expresiones se refieren a la inclusión de unos componentes particulares o conjunto de componentes sin excluir cualesquiera otros componentes. Expresiones tales como "consistiendo/ que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos, por ejemplo, éstas permiten la inclusión de componentes o etapas adicionales que no restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, es decir, éstas excluyen componentes o etapas no mencionados adicionales que restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, y éstas excluyen componentes o etapas de la técnica anterior, tal como documentos en la técnica que se indican en el presente documento o se incorporan por referencia en el presente documento, especialmente debido a que es un objetivo del presente documento definir unas realizaciones que pueden patentarse, por ejemplo, novedosas, no obvias, de la invención, sobre la técnica anterior, por ejemplo, sobre los documentos que se indican en el presente documento o que se incorporan por referencia en el presente documento. Y, las expresiones "consiste en" y "consistiendo/ que consiste en" tienen el significado que se atribuye a éstas en la ley de patentes de los Estados Unidos; a saber, que estas expresiones son cerradas. Por consiguiente, estas expresiones se refieren a la inclusión de un conjunto de componentes o un componente particular y a la exclusión de todos los otros componentes.

Conjugados inmunogénicos

[0084] Tal como se describe anteriormente, la presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con proteínas portadoras. Una realización de la invención proporciona conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína o molécula portadora que tiene una o más de las siguientes características: el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 700 kDa; el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa; y el conjugado comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total. En algunas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa. En algunas realizaciones el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa. En otras realizaciones, el conjugado comprende menos de aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 5 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total.

[0085] Los "conjugados" tal como se usan en el presente documento, comprenden un polisacárido de cápsula normalmente de un intervalo deseado de peso molecular y una proteína de portador, en el que el polisacárido de cápsula está conjugado con la proteína de portador. Los conjugados pueden o pueden no contener alguna cantidad de polisacárido de cápsula libre. Tal como se usa en el presente documento, "polisacárido de cápsula libre" se refiere a un polisacárido de cápsula que está asociado no covalentemente con (es decir, está unido no covalentemente a, adsorbido

a o atrapado en o con) el polisacárido capsular-proteína de portador conjugado. Las expresiones "polisacárido de cápsula libre", "polisacárido libre" y "sacárido libre" pueden usarse de forma intercambiable y se pretende que transmitan el mismo significado.

[0086] Con independencia de la naturaleza de la molécula portadora, esta puede conjugarse con el polisacárido capsular o bien directamente o bien a través de un ligador. Tal como se usa en el presente documento, "(para) conjugar", "conjugado/a" y "conjugando" se refieren a un procedimiento mediante el cual un polisacárido capsular bacteriano se une covalentemente a la molécula portadora. La conjugación aumenta la inmunogenicidad del polisacárido capsular bacteriano. La conjugación puede realizarse de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación o mediante otros procedimientos que se conocen en la técnica.

[0087] El peso molecular del polisacárido capsular de S. aureus es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular son capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpo debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. El aislamiento de los "polisacáridos capsulares de alto peso molecular" se contempla para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención. En una realización de la invención, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 20 kDa a 1.000 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 50 kDa a 700 kDa en peso molecular. En una

realización de la invención, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 50 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 250 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular. En una realización, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular puede aislarse y purificarse variando de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular. Otros intervalos de polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de alto peso molecular que puede aislarse y purificarse mediante los procedimientos de la presente invención incluyen de 70 kDa a 100 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 140 kDa en peso

molecular; de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 160 kDa en peso molecular; y intervalos deseados similares de peso molecular. Cualquier número entero en su totalidad dentro de cualquiera de los intervalos anteriores se contempla como una realización de la invención.

[0088] En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 5.000 kDa en peso molecular. En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 5.000 kDa en peso molecular. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 600 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 700 kDa y aproximadamente 2.700 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 2.000 kDa; de entre aproximadamente 1.800 kDa y aproximadamente 2.500 kDa; de entre aproximadamente 1.100 kDa y aproximadamente 2.200 kDa; de entre aproximadamente 1.900 kDa y aproximadamente 2.700 kDa; de entre aproximadamente 1.200 kDa y aproximadamente 2.400 kDa; de entre

aproximadamente 1.700 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.300 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.600 kDa y aproximadamente 3.000 kDa. Cualquier número entero en su totalidad dentro de cualquiera de los intervalos anteriores se contempla como una realización de la invención

[0089] Tal como se usa en el presente documento, "inmunogénica" quiere decir una capacidad de un antígeno (o un epítopo del antígeno), tal como un polisacárido capsular bacteriano o un composición inmunogénica de conjugado que comprende el antígeno, para provocar una respuesta inmunitaria en un huésped tal como un mamífero, o bien mediada de forma celular o bien humoral, o ambas. Por consiguiente, "conjugado inmunogénico" o "conjugado" tal como se usa en el presente documento quiere decir cualquier conjugado inmunogénico con contenido en un antígeno o determinante antigénico (es decir, epítopo) de un polisacárido capsular bacteriano conjugado con una molécula portadora que puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria. El conjugado inmunogénico puede servir para sensibilizar el huésped mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas de CMH en una superficie celular. Además, pueden generarse unas células T o anticuerpos específicos de antígeno para permitir la protección futura de un huésped inmunizado. Los conjugados inmunogénicos pueden por lo tanto proteger al huésped frente a uno o más síntomas asociados con una infección por bacterias, o puede proteger al huésped frente a muerte debida a la infección con bacterias asociadas con el polisacárido capsular. Los conjugados inmunogénicos pueden usarse también para generar unos anticuerpos policlonales o

180

monoclonales, que pueden usarse para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. Los conjugados inmunogénicos pueden usarse también para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0090] Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unión específica a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, que se encuentra en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otro modo por el contexto, se pretende que la expresión abarque no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos diseñados por ingeniería genética (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivados para efectuar funciones de efector, estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), anticuerpos de cadena única (ScFv) y de dominio, lo que incluye anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos a condición de que éstos exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpo tal como se describe en el presente documento, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o subclase de los mismos), y el anticuerpo no ha de ser de ninguna clase particular.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse inmunoglobulinas a clases diferentes. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2 en los seres humanos. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0091] Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte preferentemente retiene al menos una, preferentemente la mayor parte o la totalidad, de las funciones que se asocian normalmente con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto.

[0092] La expresión "antígeno" en general se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido o conjugado en una composición inmunogénica, o sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de células T, o ambas, en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria puede generarse frente a la totalidad de la molécula, o frente a varias partes de la molécula (por ejemplo, un epítopo o hapteno). La expresión puede usarse para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno se reconoce por anticuerpos, receptores de células

T u otros elementos de inmunidad humoral y/o celular específica. El "antígeno" también incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos de un antígeno dado pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de asignación de epítopos, que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols* en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Human Press, Totowa, N.J. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando de forma concurrente un gran número de péptidos en soportes sólidos, correspondiéndose los péptidos con partes de la molécula de proteína, y hacer que reaccionen los péptidos con anticuerpos a la vez que los péptidos están aún unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998 a 4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709 a 715; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. De forma similar, los epítopos conformacionales pueden identificarse determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, citado anteriormente. Además, para los fines de la presente invención, "antígeno" también puede usarse para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tal como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa, si bien éstas pueden ser no conservativas), en la secuencia nativa, a condición de que la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta

inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de una mutagénesis dirigida al sitio, o a través de unos procedimientos de síntesis particulares, o a través de un enfoque de ingeniería genética, o pueden ser accidentaels, tal como a través de mutaciones de huéspedes, que producen los antígenos. Además, el antígeno puede derivarse, obtenerse, o aislarse a partir de un microbio, por ejemplo, una bacteria, o puede ser la totalidad de un organismo. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, se incluye también en la definición. También se incluyen los antígenos de síntesis, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos derivados de forma sintética o recombinante (Bergmann y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann y col. (1996) J. Immunol. 157:3242 a 3249; Suhrbier (1997) Immunol. Cell Biol. 75:402 408; Gardner y col. (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, de 28 de Junio a 3 de Julio de 1998).

[0093] Una respuesta inmunitaria "de protección" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para provocar una respuesta inmunitaria, o bien mediada de forma celular o bien humoral, o ambas, que sirve para proteger a un sujeto frente a una infección. La protección que se prevé no ha de ser absoluta, es decir, la infección no ha de evitarse o erradicarse totalmente, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control de sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se administró la vacuna o composición inmunogénica. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o rapidez de aparición de los síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunitaria de

protección" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En situaciones particulares, una "respuesta inmunitaria de protección" podría incluir la inducción de un aumento del doble en los niveles de anticuerpos o de un aumento de cuatro veces en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En ciertas realizaciones, la opsonización de anticuerpos está relacionada con una respuesta inmunitaria de protección. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria de protección puede someterse a ensayo midiendo la disminución en porcentaje en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo, los que se describen a continuación. Preferentemente, hay una disminución en el recuento de bacterias de al menos un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 65 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más. La "cantidad inmunogénica" de un conjugado particular en una composición se dosifica en general en base al polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 conjugado con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 mcg de polisacárido no conjugado en una dosis de 100 mcg. La contribución de la proteína al conjugado no se considera normalmente cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 mcg de

polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg, y más en particular de 1 a 10 mcg.

[0094] La expresión "sujeto" se refiere a un mamífero, pájaro, pez, reptil, o cualquier otro animal. La expresión "sujeto" también incluye seres humanos. La expresión "sujeto" también incluye mascotas domésticas. Unos ejemplos no limitantes de mascotas domésticas incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, gerbos, hámsteres, cobayas, hurones, pájaros, serpientes, lagartos, peces, tortugas, y ranas. La expresión "sujeto" también incluye animales de ganado. Unos ejemplos no limitantes de animales de ganado incluyen: alpaca, bisonte, camello, ganado bovino, ciervo, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, reno, yak, gallinas, gansos, y pavos.

[0095] Tal como se muestra en la figura 1, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8 de S. aureus tienen las siguientes estructuras: serotipo 5 [→4)-β-D-ManNAcA-(1→4) -3-O-Ac -α-L-FucNAc-(1→3)-β-DFucNAc-(1→]n. y serotipo 8 [→3)-4-O-Ac-β-D-ManNAcA-(1→3)-α-L-FucNAc-(1→3)-β-DFucNAc-(1→]n. Véase el documento de Jones (2005) Carbohidr. Res. 340:1097 a 1106. El polisacárido capsular de serotipo 8 tiene unas unidades de repetición de trisacárido similares a las del polisacárido capsular de serotipo 5; no obstante, éstos se diferencian en los enlaces de azúcar y en los sitios de O-acetilación, que producen unos patrones serológicamente diferentes de inmunoreactividad (Fournier y col. (1984) Infect. Immun. 45:87 a 93; y Moreau y col. (1990) Carbohidr. Res. 201:285 a 297). Los polisacáridos capsulares de serotipo 8 y 5 son por lo tanto carbohidratos relativamente complejos que son solubles en agua, normalmente ácidos, y

se pensó anteriormente que tenían unos pesos moleculares de aproximadamente 25 kDa (Fattom (1990) Infect. Immun. 58, 2367 a 2374).

[0096] En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y/o 8 de la invención son O-acetilados. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de oligosacárido o polisacárido capsular de tipo 5 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, 50- 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de oligosacárido o polisacárido capsular de tipo 8 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, de un 50 a un 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de los oligosacáridos o polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, de un 50 a un 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %.

[0097] El grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante una RMN de protones (Lemercinier y Jones 1996, Carbohidrate Research 296; 83 a 96, Jones y Lemercinier 2002, J Pharmaceutical y Biomedical analysis 30; 1233 a 1247, documentos WO

05/033148 o WO 00/56357). Otro procedimiento que se usa normalmente se describe por Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249 a 261.

[0098] En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y/o 8 de la invención se usan para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que supervisa la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

[0099] Los polisacáridos capsulares tales como de serotipo 5 u 8 pueden obtenerse directamente a partir de bacterias usando unos procedimientos de aislamiento conocidos por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Fournier y col. (1984), citado anteriormente; Fournier y col. (1987) Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:561 a 567; publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos con n.° 2007/0141077; y la publicación de solicitud de patente internacional con n.° WO 00/56357; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad). Además, éstos pueden producirse usando protocolos de síntesis. Además, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 puede producirse de forma recombinante usando unos procedimientos de ingeniería genética también conocidos por un experto en la técnica (véase el documento de Sau y col. (1997) Microbiology 143:2395 a 2405; y la patente de los Estados Unidos con n.° 6.027.925; cada una de las cuales se

incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad).

[0100] Una cepa de S. aureus que puede usarse para obtener un polisacárido capsular de serotipo 8 aislado es la R2 PFESA0286 de S. aureus. Esta cepa se seleccionó mediante una citometría de flujo con unos anticuerpos de polisacárido de anti-serotipo 8 de conejo después de un cultivo de PFESA0286 de S. aureus (Colección Americana de Cultivos Tipo; Manassas, VA; n.° de Registro de ATCC 49525;) en caldo Frantz modificado. Dos poblaciones, R1 y R2, se observaron durante la citometría de flujo. R1 y R2 se purificaron y volvieron a cultivarse. R2 produjo un polisacárido capsular de serotipo 8. El análisis citométrico de flujo mostró una intensidad de fluorescencia homogénea. En ese sentido, R2 se seleccionó para la producción de polisacárido capsular de serotipo 8.

[0101] Una cepa de S. aureus que puede usarse para obtener un polisacárido capsular de serotipo 5 aislado es PFESA0266 de S. aureus. Esta cepa produce un polisacárido capsular de serotipo 5 durante el crecimiento, y producción alcanza su máximo cuando las células se encuentran en una fase estacionaria. Otras cepas de tipo 5 o tipo 8 de S. aureus pueden usarse para fabricar los polisacáridos respectivos que se obtienen o bien a partir de colecciones de cultivo establecidas o bien muestras clínicas.

[0102] Otro componente del conjugado inmunogénico de la invención es una proteína o molécula portadora con la que se conjuga el polisacárido capsular bacteriano. La expresión "portador de proteína" o "proteína de portador" se refiere a cualquier molécula de proteína que puede conjugarse con un

antígeno (tal como los polisacáridos capsulares) frente a la que se desea una respuesta inmunitaria. La conjugación con un portador puede aumentar la inmunogenicidad del antígeno. La conjugación puede realizarse mediante procedimientos convencionales. Los portadores de proteína preferidos para los antígenos son toxinas, toxoides o cualquier material de reacción cruzada mutante (CRM) de la toxina a partir de tétanos, difteria, tos ferina, Pseudomonas, E. coli, estafilococo y estreptococo. En una realización, un portador particularmente preferido es la CRM_{197} del toxoide diftérico, derivada de cepa C7 de C. diphtheriae (β197), que producen la proteína CRM_{197}. Esta cepa tiene un n.° de registro de ATCC 53281. Un procedimiento para producir la CRM_{197} se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.614.382, que se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. Alternativamente, un fragmento o epítopo del portador de proteína o puede usarse otra proteína inmunogénica. Por ejemplo, un antígeno hapténico puede acoplarse a un epítopo de célula T de una toxina, toxoide o CRM bacterianos. Véase la solicitud de patente de los Estados Unidos con n.° 150.688, presentada el 1 de febrero de 1988, titulada "Synthetic Peptides Representing a T-Cell Epitope as a Carrier Molecule For Conjugate Vaccines"; que se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tal como el toxoide del cólera (por ejemplo, tal como se describe en la solicitud de patente internacional con n.° WO 2004/083251), E. coli LT, E. coli ST, y exotoxina A a partir de Pseudomonas aeruginosa. También pueden usarse proteínas de

la membrana exterior bacteriana tales como el complejo de la membrana exterior c (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de superficie neumocócica A (PspA), proteína de adhesión neumocócica (PsaA) o proteína de Haemophilus influenzae D. También pueden usarse como proteínas portadoras otras proteínas, tal como ovalbúmina, hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado de proteína purificado de la tuberculina (PPD).

[0103] Por consiguiente, en una realización, la proteína de portador dentro del conjugado inmunogénico de la invención es la CRM_{197}, y la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido capsular a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos. En algunas realizaciones, la proteína de portador dentro del conjugado inmunogénico de la invención es la CRM_{197}, y la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido capsular a través de un enlace tioéter. El número de residuos de lisina en la proteína de portador que se han conjugado con un polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 5 a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el polisacárido capsular. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 40 % a un 60 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el polisacárido capsular. En algunas realizaciones, la CRM_{197} comprende de 5

a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el CP8. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP8. En algunas realizaciones, la CRM_{197} comprende de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el CP5. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 40 % a un 60 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP5.

[0104] Tal como se analiza anteriormente, el número de residuos de lisina en la proteína de portador conjugado con el polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas, que puede expresarse como una razón molar. Por ejemplo, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 18:1 a aproximadamente 22:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 15:1 a aproximadamente 25:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 16:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 14:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 12:1; de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 26:1; de aproximadamente 22:1 a aproximadamente 28:1; de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 30:1; de aproximadamente 26:1 a aproximadamente 32:1; de aproximadamente 28:1 a aproximadamente 34:1; de aproximadamente

30:1 a aproximadamente 36:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; o de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 30:1. Así mismo la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 3:1 y 25:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 4:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 17:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 16:1; o de aproximadamente 9:1 a aproximadamente 14:1.

[0105] Otra forma de expresar el número de residuos de lisina en la proteína de portador conjugado con el polisacárido capsular puede ser como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico

de CP8 dado, la CRM_{197} puede comprender de 5 a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Alternativamente, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP8 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre un 110 % y un 50 %. En algunas realizaciones, de un 20 % a un 50 % de lisinas puede tener enlace covalente con el CP8. Aún más alternativamente, de un 30 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197} puede tener enlace covalente con el CP8; de un 10 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 30 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 15 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 15 % de lisinas de CRM_{197}; o de un 10 % a un 12 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP8. Así mismo en un conjugado inmunogénico de CP5 dado, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Alternativamente, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP5 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre un 40 % y un 60 %. En algunas realizaciones, de un 40 % a un 60 % de lisinas puede tener enlace covalente con el CP5. Aún más alternativamente, de un 30 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197} puede tener enlace covalente con el CP5; de un 20 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 50 % a un 70 % de lisinas de CRM_{197}; de un 35 % a un 65 % de lisinas de CRM_{197}; de un 30 % a un 60 %

de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 55 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197}; de un 15 % a un 45 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 40 % a un 70 % de lisinas de CRM_{197}; o de un 45 % a un 75 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP5.

[0106] La frecuencia de unión de la cadena de polisacárido capsular a una lisina en la molécula portadora es otro parámetro para la caracterización de conjugados de polisacáridos de cápsula. Por ejemplo, en una realización, al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar para al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra realización, hay al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido capsular para cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 7 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 9 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 7 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 15 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 6 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 7 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada de 7 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 20 unidades de repetición de sacárido; o cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra

realización, al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido capsular tiene lugar para cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular.

[0107] Una realización de la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende cualquiera de los conjugados inmunogénicos que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador que se describe anteriormente.

[0108] La expresión "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica con contenido en un antígeno, por ejemplo, un microorganismo o un componente del mismo, composición que puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger a o para tratar un ser humano susceptible de infección por S. aureus, por medio de administración de las composiciones inmunogénicas a través de una vía sistémica, dérmica o mucosa o usarse para generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales que podría usarse para conferir inmunidad pasiva a otro sujeto. Estas administraciones pueden incluir una inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, se usa una administración intranasal para el tratamiento o prevención de estado nasofaríngeo de portador de S. aureus, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana. Pueden usarse también composiciones inmunogénicas para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como

188

se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

[0109] Pueden determinarse unas cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular mediante unos estudios convencionales que implican la observación de unas respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

[0110] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir también uno o más de los siguientes antígenos: ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE MntC/SitC/Proteína de unión de saliva, IsdB, IsdA, Opp3a, DltA, HtsA, LtaS, SdrH, SrtA, SpA, SBI, alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína A de unión a fibronectina (fnbA), coagulasa, map, leucocidina Panton-Valentine (pvl), gamma-toxina (hlg), ica, transportador ABC inmunodominante, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, SasF, SasH, EFB (FIB), FnbB, Npase, EBP, sialoproteína II de unión a hueso, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna, TSST-1, mecA, dPNAG, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2 HBP, proteína de unión a vitronectina, HarA, Enterotoxina A, Enterotoxina B, Enterotoxina C1, y autolisina novedosa.

[0111] En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden además al menos uno de un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación por radicales libres, un diluyente o un portador. En una realización, el adyuvante dentro de la composición inmunogénica de la

invención es un adyuvante basado en aluminio. En una realización, el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio que se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización, el adyuvante es fosfato de aluminio.

[0112] Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha mostrado que un número de citocinas o linfocinas tienen una actividad de modulación inmunitaria, y por lo tanto pueden ser útiles de una forma igual o similar a adyuvantes, incluyendo, pero sin limitarse a, las interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones-α, β y γ; factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-LCR) (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 5.078.996 y número de Registro de ATCC 39900); factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-LCR); factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-LCR); y los factores de necrosis tumoral α y β. Aún otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento incluyen quimiocinas, incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES; moléculas de adhesión, tal como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas de tipo mucina, por ejemplo, CD34, GlycAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas tal como PECAM, ICAMs, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tal como B7-1, B7-2, CD40 y CD40L;

factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1, y factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas de receptor incluyendo Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6; y caspasas, incluyendo ICE.

[0113] Adyuvantes adecuados que se usan para aumentar una respuesta inmunitaria pueden incluir además, sin limitación, MPL™ (lípido monofosforílico 3-O-desacilado A, Corixa; Hamilton, MT), que se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes, análogos de lípido A de síntesis o compuestos de fosfato de aminoalquilglucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles a través de Corixa, y los que se describen en la patente de los Estados Unidos con n.° 6.113.918. Un AGP de este tipo es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranósido, que se conoce también como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (AF) o como una emulsión estable (SE).

[0114] Aún otros adyuvantes incluyen péptidos de muramilo, tal como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de aceite en agua, tal como MF59 (patente de los Estados Unidos con n.° 6.299.884) (que contiene un 5 % de escualeno, un 0,5 % de

Polysorbate 80, y un 0,5 % de Span 85 (que opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE) que se formulan para dar partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), y SAF (que contiene un 10 % de escualeno, un 0,4 % de Polysorbate 80, un 5 % de polímero L121 bloqueado con Pluronic, y thr-MDP, o bien microfluidizado para dar una emulsión submicrométrica o bien mediante agitación con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande); adyuvante de Freund incompleto (IFA); sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Amphigen; Avridine; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glicósido; polioles de Pluronic; Bordetella inactivada; saponinas, tal como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), que se describen en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.057.540, Iscomatrix® (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.254.339, y complejos inmunoestimulantes (ISCOMS); tuberculosis por Mycobacterium; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos de síntesis tales como oligonucleótidos con contenido en un motivo de CpG (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 6.207.646); CI-31 (Intercell AG, Viena, Austria), que se describe en las patentes EP con n.ºs 1.296.713 y 1.326.634; una toxina de tos ferina (PT) o una mutante de la misma, una toxina de cólera o una mutante de la misma (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o an E. coli heat-labile toxina (LT) o una mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-

R72 (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

[0115] La composición inmunogénica puede comprender opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" quiere decir un portador aprobado por una agencia de regulación de un gobierno estatal, uno Federal, u otra agencia de regulación, o que se enumera en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, incluyendo seres humanos así como mamíferos no humanos. La expresión "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Agua, soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden emplearse como portadores líquidos, en particular para disoluciones inyectables. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. La formulación ha de adecuarse al modo de administración.

[0116] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender además uno o más "inmunomoduladores" adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmunitario, de tal modo que se observa o bien una regulación por aumento o bien una regulación por disminución de inmunidad mediada de forma celular y/o humoral. En una realización, se prevé la regulación por aumento de las armas mediadas de forma celular y/o humoral del sistema inmunitario. Ejemplos de ciertos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citocina, o Iscomatrix® (CSL Limited; Parkville, Australia), que se describe en la patente

de los Estados Unidos con n.º 5.254.339 entre otros. Unos ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden usarse en la composición inmunogénica de la presente invención incluyen el sistema de adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completos y incompletos de Freund, copolímero de Block (CytRx; Atlanta, GA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), Adyuvante Amphigen®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, lípido monofosforílico A, y adyuvante lípido-amina Avridine. Unos ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la composición inmunogénica de la invención incluyen las formulaciones SEAM62 y SEAM 1/2 modificadas. La SEAM62 modificada es una emulsión de aceite en agua con contenido en un 5 % (v/v) de escualeno (Sigma), un 1 % (v/v) de detergente Span® 85 (ICI Surfactants), un 0,7 % (v/v) de detergente de Polysorbate 80 (ICI Surfactants), un 2,5 % (v/v) de etanol, 200 mcg/ml de Quil A, 100 mcg/ml de colesterol, y un 0,5 % (v/v) de lecitina. La SEAM 1/2 modificada es una emulsión de aceite en agua que comprende un 5 % (v/v) de escualeno, un 1 % (v/v) de detergente Span® 85, un 0,7 % (v/v) de detergente de Polysorbate 80, un 2,5 % (v/v) de etanol, 100 mcg/ml de Quil A, y 50 mcg/ml de colesterol. Otros "inmunomoduladores" que pueden incluirse en la composición inmunogénica incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones, u otras citocinas o quimiocinas conocidas otras citocinas o quimiocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como los que

se describen en las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Ha de entenderse que el inmunomodulador y/o adyuvante que va a usarse dependerá del sujeto al que se administrará la composición inmunogénica, la vía de inyección y el número de inyecciones que van a darse.

[0044] Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además uno o más conservantes además de una pluralidad de conjugados de polisacárido capsular estafilocócico-proteína. La FDA requiere que los productos biológicos en viales de múltiples dosis (múltiples dosis) contengan un conservante, con sólo unas pocas excepciones. Los productos de vacuna con contenido en conservantes incluyen vacunas con contenido en cloruro de benzetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabies). Conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparaben, propilparaben, 2-fenoxietanol, cloruro de benzetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato fenilmercúrico.

[0117] Las formulaciones de la invención pueden comprender además uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar, y un antioxidante tal como un eliminador de radicales libres o agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de un componente cualquiera, por ejemplo, un agente de quelación, puede determinar si es deseable otro componente (por ejemplo, un eliminador) o no. La composición final que se formula para la

administración ha de ser estéril y/o libre de pirógenos. El experto puede determinar de forma empírica qué combinaciones de estos y otros componentes serán óptimas para la inclusión en las composiciones inmunogénicas con contenido en conservante de la invención, dependiendo de una variedad de factores tales como las condiciones de almacenamiento y de administración particulares que se requieren.

[0118] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones fisiológiamente aceptables que se seleccionan de, pero sin limitarse a, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En ciertas realizaciones, la formulación está tamponada a dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

[0119] En ciertas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición inmunogénica o formulación de la invención. El pH de una formulación de la invención puede ajustarse usando técnicas convencionales en la técnica. El pH de la formulación puede ajustarse para ser de entre 3,0 y 8,0. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede ajustarse para ser, entre 3,0 y 6,0, 4,0 y 6,0, o 5,0 y 8,0. En otras realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede ajustarse para ser, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, o aproximadamente 8,0. En ciertas realizaciones, el pH puede ser, o puede ajustarse para ser, en un

intervalo de 4,5 a 7,5, o de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2, de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,5, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 o de 7,5 a 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,8.

[0120] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluyendo pero sin limitarse a, MgCl2, CaCl2 y MnCl2, a una concentración variando de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, prefiriéndose con hasta aproximadamente 5 mM.

[0121] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, incluyendo pero sin limitarse a, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, y sulfato de potasio, presentes a una fuerza iónica que es fisiológiamente aceptable por el sujeto tras la administración parenteral e incluidas a una concentración final para producir una fuerza iónica u osmolaridad seleccionadas en la formulación final. La fuerza iónica u osmolalidad finales de la formulación se determinará por múltiples componentes (por ejemplo, iones de compuesto(s) de tamponamiento y otras sales de no tamponamiento. Una sal preferida, NaCl, está presente desde un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, seleccionándose las concentraciones de sal para complementar otros componentes (por ejemplo, azúcares) de tal modo que la osmolaridad total final de la formulación es compatible con la administración parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea) y promoverá la estabilidad a largo plazo de los

componentes inmunogénicos de la formulación de composición inmunogénica a lo largo de varios intervalos de temperatura. Formulaciones libres de sal tolerarán intervalos aumentados del uno o más crioprotectores seleccionados para mantener los niveles de osmolaridad finales deseados.

[0122] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores que se seleccionan de, pero sin limitarse a, disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) y polihidroxi-hidrocarburos (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

[0123] En ciertas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 200 mOs/L a aproximadamente 800 mOs/L, con un intervalo preferido de aproximadamente 250 mOs/L a aproximadamente 500 mOs/L, o aproximadamente 300 mOs/L a aproximadamente 400 mOs/L. Una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 25 % de sacarosa, y preferentemente de aproximadamente un 7 % a aproximadamente un 15 %, o aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 12 % de sacarosa. Alternativamente, una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 12 % de sorbitol, y preferentemente de aproximadamente un 4 % a un 7 %, o aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 6 % de sorbitol. Si se añade una sal tal como cloruro de sodio, entonces el intervalo eficaz de sacarosa o sorbitol se reduce relativamente. Estas y otras consideraciones tales como la osmolalidad y la osmolaridad se conocen bien en la técnica.

[0124] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres y/o agentes quelantes. Una variedad de eliminadores de radicales libres y agentes de quelación se conocen en la técnica y se aplican a las formulaciones y los procedimientos de uso que se describen en el presente documento. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA, y varias combinaciones de dos o más de los anteriores. En ciertas realizaciones, al menos puede añadirse un eliminador de radicales libres no reductor a una concentración que aumenta eficazmente la estabilidad a largo plazo de la formulación. También puede añadirse uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres/agentes de quelación en varias combinaciones, tal como un eliminador y un catión divalente. La elección de agente de quelación determinará si es necesaria o no la adición de un eliminador.

[0125] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos iónicos, incluyendo pero sin limitarse a, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitano, Polysorbate-80 (Tween 80), Polysorbate-60 (Tween 60), Polysorbate-40 (Tween 40) y Polysorbate-20 (Tween 20), polioxietileno-alquil éteres, incluyendo pero sin limitarse a, Brij 58, Brij 35, así como otros tales como Triton X-100; Triton X- 114, NP40, Span 85 y la serie de tensioactivos no iónicos de Pluronic (por ejemplo, Pluronic 121), con

componentes preferidos Polysorbate-80 a una concentración de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,25 %) o Polysorbate-40 a una concentración de aproximadamente de un 0,001 % a un 1 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,5 %).

[0126] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes de estabilización adicionales adecuados para su administración parenteral, por ejemplo, un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ejemplo, cisteína, N-acetilcisteína, glutatión reducido, tioglicolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol, o mezclas de los mismos). Alternativa u opcionalmente, las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden estabilizarse adicionalmente eliminando el oxígeno de los recipientes de almacenamiento, protegiendo a la formulación de la luz (por ejemplo, usando recipientes de vidrio de color ámbar).

[0127] Las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden comprender uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que incluye cualquier excipiente que no induce por sí mismo una respuesta inmunitaria. Los excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col, 2001, Vaccine, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales portadores son bien conocidos por el experto. Excipientes farmacéuticamente aceptables se analizan, por

ejemplo, en Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN:0683306472.

[0128] Las composiciones de la invención pueden estar liofilizadas o en forma acuosa, es decir disoluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas pueden administrarse de forma ventajosa directamente a partir de su forma envasada y son por lo tanto ideales para inyección sin la necesidad de reconstitución en medio acuoso tal como se requiere de otro modo para composiciones liofilizadas de la invención.

[0129] La administración directa de composiciones inmunogénicas de la presente invención a un sujeto puede llevarse a cabo mediante la administración parenteral (por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intravenosa, o en el espacio intersticial de un tejido); o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. En una realización preferida, la administración parenteral es mediante inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o el brazo del sujeto. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección libre de aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. Las composiciones de la invención pueden prepararse en varias formas, por ejemplo, para inyección o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones. En ciertas realizaciones, la composición puede prepararse como un polvo o pulverización para su administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición puede prepararse como un supositorio u óvulo vaginal, o para su administración

nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como una pulverización, gotas, gel o polvo.

[0130] La cantidad de conjugado en cada dosis de composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Tal cantidad puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 µg, y más en particular de 1 a 5 µg.

[0131] Pueden determinarse unas cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular mediante unos estudios convencionales que implican la observación de unas respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

Acondicionamiento y formas farmacéuticas

[0132] Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden envasarse forma de dosis unitaria o múltiples dosis (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis, o más). Para formas de múltiples dosis, habitualmente pero no necesariamente se prefieren los viales con respecto a las jeringuilla previamente cargadas. Los formatos de múltiples dosis adecuados incluyen pero no se limitan a: de 2 a 10 dosis por recipiente a 0,1 a 2 ml por dosis. En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO2007/127668, que se incorpora por referencia en el presente documento.

Las composiciones pueden presentarse en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o pueden presentarse en dispositivos de administración cargados previamente, por ejemplo, jeringuillas de un solo componente o múltiples componentes, que pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringuilla habitualmente, pero no necesariamente, contiene una dosis individual de la composición inmunogénica con contenido en conservante de la invención, a pesar de que también se prevén jeringuillas de múltiples dosis, cargadas previamente. De forma similar, un vial puede incluir una dosis individual pero alternativamente puede incluir múltiples dosis.

[0133] Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano adulto, joven, adolescente, niño o lactante (es decir, no más de un año de edad) y en realizaciones preferidas puede administrarse mediante inyección.

[0134] Las composiciones inmunogénicas líquidas de la invención son también adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando una composición inmunogénica va a usarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringuillas cargadas preparadas, o uno o más de cada, usándose el contenido de la jeringuilla para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección, o viceversa.

[0135] Alternativamente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden liofilizarse y reconstituirse, por ejemplo, usando uno de una multitud de procedimientos para la liofilización que se conocen bien en la técnica para formar partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esférica), tal como microgránulos o esferas, que tienen características de partícula tales como tamaños de diámetro medio que pueden seleccionarse y controlarse variando los procedimientos exactos que se usan para prepararlos. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender además un adyuvante que puede prepararse opcionalmente con o estar contenido en partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esféricas) separadas tales como microgránulos o esferas. En tales realizaciones, la presente invención proporciona además un kit de composición inmunogénica que comprende un primer componente que incluye una composición inmunogénica seca, estabilizada, que comprende además opcionalmente uno o más conservantes de la invención, y un segundo componente que comprende una disolución acuosa, estéril, para la reconstitución del primer componente. En ciertas realizaciones, la disolución acuosa comprende uno o más conservantes, y puede comprender opcionalmente al menos un adyuvante (véase, por ejemplo, el documento WO2009/109550 (que se incorpora en el presente documento por referencia).

[0136] Aún en otra realización, un recipiente del formato de múltiples dosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, artículos de vidrio de laboratorio generales, matraces, vasos de precipitados, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, jarras, viales, cierres para viales (por ejemplo, un tapón de caucho, un

tornillo en la tapa), ampollas, jeringuillas, jeringuillas de doble cámara o de múltiples cámaras, tapones de jeringuilla, émbolos de jeringuillas, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El recipiente de la presente invención no está limitado en cuanto al material de fabricación, e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una realización particular, el recipiente del formato es un vial de vidrio Schott tipo 1 de 5 ml con un tapón de butilo. El experto apreciará que el formato expuesto anteriormente no es de ningún modo una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como guía para el experto con respecto a la variedad de formatos disponibles para la presente invención. Formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención pueden encontrarse en catálogos publicados de vendedores y fabricantes de equipos de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Procedimientos para fabricar conjugados inmunogénicos

[0137] La presente invención también incluye procedimientos de fabricación de los conjugados inmunogénicos que se describen en el presente documento. Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol), CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida).

[0138] Por consiguiente, una realización de la invención proporciona un procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) combinar un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con imidazol o triazol para producir un polisacárido combinado; b) hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT en un disolvente orgánico y aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 % p/v de agua para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado; c) purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado; d) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado con una proteína de portador en el disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador; y e) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador. En una realización, antes de la etapa (d), el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado se combina con una proteína de portador.

[0139] En una realización de la invención, se prevé otro procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a)

combinar un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con imidazol o triazol para producir un polisacárido combinado; b) hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT en un disolvente orgánico y aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 % p/v de agua para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado; c) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado con una proteína de portador en el disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador; y d) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador.

[0140] En una realización, el disolvente orgánico dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico es un disolvente aprótico polar. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar que se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA). En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

[0141] En una realización, la etapa de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende proporcionar aproximadamente un exceso molar de 20 veces de CDT en comparación con el polisacárido.

En una realización, la etapa de purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende una diafiltración.

[0142] En una realización, la proteína de portador dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico es la CRM_{197}. En una realización, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación de un conjugado inmunogénico se hace que reaccione con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

[0143] En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico comprende la dilución en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C. En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende la dilución en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

[0144] En una realización, se purifica el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que se produce de acuerdo con los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico. En una realización, la purificación del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende una diafiltración.

[0145] En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT dentro de los procedimientos de fabricación basados en CDT de un conjugado inmunogénico, el polisacárido combinado de serotipo 5 u 8 se liofiliza y resuspende. En una realización, tanto el polisacárido combinado como la proteína de portador son por separado liofilizado y se resuspenden antes de hacer que reaccione el polisacárido combinado con CDT. En una realización, el polisacárido combinado liofilizado y/o la proteína de portador liofilizada se resuspenden en un disolvente orgánico. En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

[0146] En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado combinado con una proteína de portador dentro del procedimiento de fabricación basado en CDT de un conjugado inmunogénico, el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado y la proteína de portador se liofilizan por separado y se resuspenden. En una realización, la proteína de portador es la CRM_{197} y antes de la liofilización la CRM_{197} se somete a diafiltración frente a NaCl. En una realización, antes de la liofilización la CRM_{197} se somete a diafiltración frente a NaCl y la razón en p/p de NaCl/CRM se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5.

[0147] Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento de fabricación basado en PDPH de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus con PDPH y una carbodiimida en un

disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH; b) hacer que reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado; c) purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado para producir un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado; d) hacer que reaccione una proteína de portador con un ácido bromoacético en un disolvente orgánico para producir una proteína de portador activada; e) purificar la proteína de portador activada para producir una proteína de portador activada purificada; f) hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado con la proteína de portador activada purificada para producir un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador; y g) hidrolizar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador.

[0148] En una realización, el ácido bromoacético que se usa dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es un éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS). En una realización, la proteína de portador que se usa dentro de los procedimientos basados en PDPH de la invención es la CRM_{197} y el BAANS se añade en una razón en peso de CRM_{197}:BAANS de aproximadamente 1:0,1 a aproximadamente 1:0,5.

[0149] En una realización, el disolvente orgánico dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es un disolvente aprótico polar. En una realización, el

disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar que se selecciona del grupo que consiste en DMSO, DMF, dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y HMPA. En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

En una realización, la carbodiimida que se usa dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC). En una realización, la etapa de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 con PDPH y EDAC en un disolvente orgánico comprende mantener una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de aproximadamente 1:5:3.

[0150] En una realización, el agente reductor que se usa dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es ditiotreitol (DTT).

[0151] En una realización, cada una de las etapas de purificar el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado y purificar la proteína de portador dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico comprende diafiltración.

[0152] En una realización, la proteína de portador dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico es la CRM_{197}. En una realización, el polisacárido de serotipo 5 u 8 activado dentro de los procedimientos de fabricación de un conjugado inmunogénico se hace que reaccione con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

[0153] En una realización, la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo 5 o 8-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar dentro de los procedimientos de fabricación

basados en PDPH de un conjugado inmunogénico comprende la adición de clorhidrato de cisteamina.

[0154] En una realización, se purifica el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador que se produce de acuerdo con los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico. En una realización, la purificación del conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o 8-proteína de portador comprende una diafiltración.

[0155] En una realización, antes de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo 5 u 8 activado purificado con la proteína de portador activada purificada dentro de los procedimientos de fabricación basados en PDPH de un conjugado inmunogénico, tanto el polisacárido activado purificado como la proteína de portador activada purificada se liofilizan por separado y se resuspenden. En una realización, el polisacárido activado liofilizado y/o la proteína de portador activada liofilizada se resuspenden en un disolvente orgánico. En una realización, el disolvente orgánico es DMSO.

[0156] Tal como se usa en el presente documento, "liofilización" quiere decir un procedimiento de deshidratación el que el polisacárido capsular bacteriano se congela mientras que se reduce la presión del entorno en presencia de suficiente calor para permitir que el agua congelada sublime directamente a partir de una fase sólida hasta una fase gaseosa. Puede usarse procedimiento conocido en la técnica para liofilizar polisacáridos. Véase, por ejemplo, Harris & Angal (1989) "Protein Purification Methods", en: Kennedy & Cabral, eds. "Recovery Procedimientos for Biological Materials" (John Wiley & Sons; 1993); la patente de los Estados Unidos con n.°

200

4.134.214; y la publicación de solicitud de patente internacional con n.° WO 2003/086471; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad. Opcionalmente, puede incluirse un crioprotector durante la liofilización, tal como, por ejemplo, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, arabinosa, xilosa, galactosa, sorbitol o manitol.

[0157] Tal como se usa en el presente documento, "activar" y "activación" quiere decir que un polisacárido capsular bacteriano o proteína de portador se modifica de tal modo que se vuelve sensible a conjugación (es decir, al menos un resto debe hacerse capaz de unirse covalentemente a la molécula portadora). Por ejemplo, con respecto a Procedimientos de conjugación basados en CDT de la presente invención, el polisacárido se activa en un entorno de baja humedad (por ejemplo, en DMSO) para formar restos de carbamato de triazol con restos adiltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. Los polisacáridos activados pueden hacerse reaccionar a continuación con la proteína CRM_{197}, lo que conduce al desplazamiento nucleofílico del triazol mediante residuos de lisina dentro de CRM_{197} y formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Por el contrario, con respecto a los procedimientos de conjugación basados en PDPH de la presente invención, tanto las proteínas portadoras como los polisacáridos se activan antes de la conjugación: 1) la activación de CRM_{197} implica introducir grupos bromoacetilo en la proteína CRM_{197} mediante reacción de grupos amina con el éster de N-hidroxisuccimida de ácido bromoacético; y 2) la activación de polisacárido implica acoplar la carbodiimida-grupos carboxilato activados de

Ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido con el grupo hidrazida del ligador heterobifuncional de hidrazida reactiva-sulfhidrilo PDPH, seguido por la reducción con DTT. Los polisacáridos activados pueden hacerse reaccionar a continuación con la proteína de portador activada de tal modo que los tioles de PDPH-polisacáridos tiolados reaccionan con grupos bromoacetilo de proteína de portador activada dando como resultado un enlace covalente de tioéter formado por desplazamiento de bromuro.

[0158] De acuerdo con los procedimientos de la invención, pueden purificarse los polisacáridos capsulares, proteínas portadoras, y/o conjugados de polisacárido-proteína. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para purificar polisacáridos o proteínas, tal como concentración/diafiltración, precipitation/elución, cromatografía en columna y filtración profunda. Véase, por ejemplo, Farrés y col. (1996) Biotechnol. Tech. 10:375 a 380; Gonçalves y col. en: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (Antonio Mendez Vilas, ed. 1ª ed. Badajoz, España: Formatex; 2007. págs. 450 a 457); Tanizaki y col. (1996) J. Microbiol. Methods 27:19 a 23; y la patente de los Estados Unidos con n.° 6.146.902; y la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos con n.° 2008/0286838; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad.

[0159] Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aislado" o "purificado" quiere decir que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de manera natural o de su organismo huésped si éste es una entidad recombinante, o se lleva de un

201

entorno a un entorno diferente). Por ejemplo, un polisacárido aislado, péptido o proteína está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes en la célula o fuente de tejido de la que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente o está presente de otro modo en una mezcla como parte de una reacción química. En la presente invención, la proteína o polisacárido puede aislarse a partir de la célula bacteriana o a partir del residuo celular, de tal modo que se proporcionan en una forma útil en la fabricación de una composición inmunogénica. La expresión "aislado" o "aislar" puede incluir purificar, o purificación, incluyendo por ejemplo, los procedimientos de purificación de los polisacáridos capsulares, tal como se describe en el presente documento. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polisacárido/polipéptido/proteína en las que el polisacárido/polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un polipéptido/proteína, polisacárido, o conjugado que está sustancialmente libre de material celular u otros compuestos incluye preparaciones del polipéptido/proteína, polisacárido, o conjugado que tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 2,5 % o un 1 % (en peso seco) de proteína, polisacárido, u otros compuestos contaminantes. Cuando el polipéptido/proteína se produce de forma recombinante, está también preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, o un 1

% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el polipéptido/proteína o polisacárido se produce mediante síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína o polisacárido. Por consiguiente, tales preparaciones del polipéptido/proteína o polisacárido tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, o un 1 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del fragmento de polipéptido/proteína o polisacárido de interés.

[0160] Los conjugados inmunogénicos que se producen mediante cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento pueden almacenarse en agua o en un tampón de pH neutro de baja fuerza iónica o liofilizarse en un polvo seco.

Procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria y proteger frente a infección por S. Aureus

[0161] La presente invención también incluye procedimientos de uso para composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Por ejemplo, una realización de la invención proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria frente a S. aureus que comprende la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Una realización de la invención proporciona un procedimiento de protección de un sujeto frente a una infección con S. aureus, o un procedimiento de prevención de infección con S. aureus, o un procedimiento

de reducción de la gravedad de o retardo de la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por S. aureus, comprendiendo los procedimientos la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Una realización de la invención proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma terapéutica o profiláctica de una composición inmunogénica que se describe en el presente documento al sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento de tratamiento o prevención de una infección, enfermedad o afecciones por estafilococos comprende tratamiento en seres humanos, veterinaria, en animales o en la agricultura. Otra realización proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de la composición inmunogénica que se describe en el presente documento, y usando dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Una realización de la invención proporciona un procedimiento de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad eficaz de forma profiláctica de una

composición inmunogénica que se describe en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

[0162] Una "respuesta inmunitaria" frente a un antígeno o composición inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células frente a moléculas presentes en el antígeno o composición de vacuna de interés. Para los fines de la presente invención, 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 por el antígeno en la composición inmunogénica de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria mediada por células" es una respuesta mediada por células T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" se provoca mediante la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas de clase I o de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), CD1 u otras moléculas similares al CMH no clásicas. Ésta activa células T CD4+ cooperadoras específicas de antígeno o linfocitos T citotóxicos CD8+ ("CTL"). Los CTL tienen espeficificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por CMH clásicos y no clásicos y se expresan sobre las superficies de células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante las células T cooperadoras. Las células T cooperadoras actúan para ayudar a estimular la función, y enfocan la actividad de, células efectoras no específicas frente a células que presentan

péptido u otros antígenos en asociación con moléculas clásicas o no clásicas de CMH en su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo que se producen mediante células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluyendo las derivadas de células T CD4+ y CD8+. La capacidad de una composición o antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante un número de ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, sometiendo a ensayo linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medición de la producción de citocinas por células T en respuesta a la reestimulación con antígeno. Tales ensayos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col. (1993) J. Immunol. 151:4189 a 4199; y Doe y col. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369 a 2376.

[0163] Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") quiere decir uno o más cualquiera de lo siguiente: (i) la prevención de infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la gravedad de, o, en la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de infección) o terapéuticamente (tras la infección). En la presente invención, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunizar de forma profiláctica y/o terapéutica, un huésped

animal frente a una infección microbiana (por ejemplo, una bacteria tal como estafilococo). Los procedimientos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los procedimientos de la presente invención pueden también ponerse en práctica en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

[0164] Tal como se usa en el presente documento, "mamífero" quiere decir un ser humano o animal distinto de ser humano. Más en particular, mamífero se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportivos y mascotas de compañía tales como una mascota doméstica y otro animal domesticado incluyendo, pero sin limitarse a, ganado bovino, ovejas, hurones, cerdos, caballos, conejos, cabras, perros, gatos, y similares. Los animales de compañía preferidos son perros y gatos. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

[0165] Una "cantidad inmunogénica", y "cantidad inmunológicamente eficaz", usándose ambas de forma intercambiable en el presente documento, se refiere a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, o bien una respuesta celular (célula T) o bien humoral (células B o anticuerpo), o ambas, tal como se mide por ensayos convencionales conocidos por un experto en la técnica.

[0166] Las cantidades de un conjugado particular en una composición se calculan en general en base al polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado de CP5 con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido CP5 conjugado y aproximadamente 20 mcg de polisacárido CP5 no conjugado en

una dosis de polisacárido CP5 de 100 mcg. La contribución de la proteína al conjugado no se considera normalmente cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 mcg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg, y más en particular de 1 a 10 mcg. La "cantidad inmunogénica" de los componentes de polisacárido diferentes en la composición inmunogénica, puede divergir y cada uno puede comprender 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, o aproximadamente 100 mcg de cualquier antígeno de polisacárido particular.

[0167] "Enfermedad invasiva" por S. aureus es el aislamiento de bacterias a partir de un sitio normalmente estéril, en el que están asociados signos/síntomas clínicos de enfermedad. Los sitios del organismo normalmente estériles incluyen sangre, LCR, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido articular/sinovial, hueso, sitio interno del organismo (ganglio linfático, cerebro, corazón, hígado, bazo, fluido vítreo, riñón, páncreas, ovario) u otros sitios normalmente estériles. Las afecciones clínicas que caracterizan a las enfermedades invasivas incluyen bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, choque septicémico y más.

[0168] La eficacia de un antígeno como un inmunógeno, puede medirse o bien mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de una célula T para lisar su célula diana específica, o bien midiendo los niveles de actividad de células B midiendo los niveles de anticuerpos en circulación

específicos para el antígeno en el suero. Una respuesta inmunitaria puede detectarse también midiendo los niveles en suero de anticuerpo específico de antígeno que se induce a continuación de la administración del antígeno, y más específicamente, midiendo la capacidad de los anticuerpos que se inducen de tal forma para aumentar la capacidad opsonofagocítica de glóbulos blancos particulares, tal como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria puede medirse exponiendo el huésped inmunizado al antígeno que se ha administrado. Por ejemplo, si el antígeno con respecto al que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección que se induce mediante la cantidad inmunogénica del antígeno se mide detectando el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de una exposición de los animales a las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección puede medirse midiendo al menos un síntoma asociado con la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada con la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna o en las composiciones inmunogénicas multiantígeno o multicomponente variará con respecto a cada uno de los otros componentes y puede determinarse mediante procedimientos conocidos por el experto. Tales procedimientos incluirían unos procedimientos para medir la inmunogenicidad y/ o la eficacia en vivo. En ciertas realizaciones, la expresión "aproximadamente" quiere decir dentro de un 20 %, preferentemente dentro de un 10 %, y más preferentemente dentro de un 5 %.

[0169] La invención proporciona además anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a los conjugados

205

inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de la presente invención. En algunas realizaciones, los anticuerpos se generan después de la administración a un sujeto de los conjugados inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de la presente invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona unos anticuerpos purificados o aislados que se dirigen contra uno o más de los conjugados inmunogénicos o polisacáridos capsulares de serotipo 5 u 8 de la presente invención. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente invención proporciona además unas moléculas de polinucleótido que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y una célula, línea celular (tal como células de hibridoma u otras líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para la producción recombinante de anticuerpos) o un animal transgénico que produce un anticuerpo o una composición de anticuerpo de la invención, usando unas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

[0170] Los anticuerpos o composiciones de anticuerpos de la invención pueden usarse en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales, y el uso de dicho anticuerpo o composición de anticuerpo para conferir

inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles también para procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, detectar la presencia o cuantificar los niveles de CP5, de CP8 o de un conjugado de los mismos.

[0171] Varios modelos animales que se conocen en la técnica pueden usarse para evaluar la eficacia de una cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento. Por ejemplo:

[0172] Modelo murino de septicemia pasivo: Se inmunizan unos ratones de forma pasiva por vía intraperitoneal (i.p.) con IgG inmunitario o anticuerpo monoclonal. Los ratones se exponen 24 horas más tarde a una dosis letal de S. aureus. La exposición bacteriana se administra por vía intravenosa (i.v. o i.p.) lo que asegura que cualquier supervivencia puede atribuirse a la interacción en vivo específica del anticuerpo con las bacterias. Se determina que la dosis de exposición bacteriana es la dosis que se requiere para conseguir una septicemia letal de aproximadamente un 20 % de los ratones de control no inmunizados. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede llevarse a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

[0173] Inmunización activa y modelo de exposición: En este modelo, se inmunizan unos ratones de forma activa por vía subcutánea (SC) con un antígeno diana a 0, 3 y 6 semanas (o un programa similar conocido por los expertos en la técnica) y se exponen a S. aureus en la semana 8 (o otro programa similar conocido por los expertos en la técnica) por la vía intravenosa o intraperitoneal. La dosis de exposición bacteriana se calibra para obtener aproximadamente un 20 % supervivencia en el grupo de control a lo largo de un periodo de 14 días. La evaluación estadística de los estudios

de supervivencia puede llevarse a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

[0174] Modelo de endocarditis infecciosa pasiva: Un modelo de inmunización pasiva para endocarditis infecciosa (IE) causada por S. aureus se ha usado anteriormente para mostrar que el ClfA puede inducir una inmunidad protectora. Véase el documento de Vernachio y col. (2006) Antmicro. Agents & Chemo. 50:511 a 518. En este modelo de IE, se usan conejos o ratas para simular unas infecciones clínicas que incluyen un catéter venoso central, bacteriemia, y siembra hematógena a órganos distales. A unos conejos o ratas cateterizados con vegetaciones de válvula aórtica estériles se les administra una única inyección intravenosa de un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para el antígeno diana. Después de 24 horas, los animales se exponen por vía i.v. a una cepa de MRSA o a cepas estafilocócicas heterólogas. A continuación, 48 horas después de una exposición, las vegetaciones cardíacas, los riñones y la sangre se recolectan y se cultivan. La frecuencia de infección por estafilococos en las vegetaciones de válvula cardíaca, los riñones y la sangre se mide a continuación. En un estudio, cuando los animales se expusieron a o bien MRSE ATCC 35984 o bien MRSA PFESA0003, se mostraron unas reducciones significativas en la velocidad de infección usando o bien la preparación de anticuerpos policlonales o bien la de anticuerpos monoclonales to ClfA. Véase el documento de Vernachio y col., citado anteriormente.

[0175] Modelo de endocarditis infecciosa pasiva: El modelo de endocarditis infecciosa se ha adaptado también para los estudios de inmunización activa.

Se inmunizan conejos o ratas por vía intramuscular (IM) con un antígeno diana y se exponen a S. aureus dos semanas más tarde a través de la vía i.v..

[0176] Modelo de pielonefritis: En el modelo de pielonefritis, se inmunizan ratones en las semanas 0, 3 y 6 (o un programa similar conocido por los expertos en la técnica) con los antígenos diana. En la semana 8, los animales se exponen mediante, por ejemplo, una inyección por vía i.p. de, por ejemplo, 1,7 x 10^8 ufc PFESA0266 de S. aureus. Después de 48 horas, los riñones y/o otros tejidos se recolectan y se cultivan. Por último, se recuentan las unidades de formación de colonias de exposición bacterias en los riñones y/o en otros tejidos. Este modelo evalúa la diseminación sistémica en el animal.

Supervisión de anticuerpos funcionales usando ensayos de destrucción opsonofagocíticas

[0177] Las células efectoras diferenciadas a partir de una línea celular (por ejemplo, HL60) o células polimorfonucleares (PMN) aisladas de sangre de donante humano usando una disolución LYMPHOLYTE®-poli (Cedarlane laboratories limited, Ontario, Canadá), de acuerdo con el protocolo del fabricante, pueden usarse para este ensayo. Las células efectoras volvieron a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado con contenido en un 1 % de albúmina de suero bovino) a una concentración de aproximadamente 2 X 10^7 células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 ºC hasta que estuvieron listas para su uso. Se hizo que la cepa de S. aureus PFESA0266 creciera durante la noche sobre unas placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y

volvieron a suspenderse en tampón de ensayo con un contenido de un 5 % de glicerol a una DO 600 = 1, lo que es igual a una concentración de aproximadamente 5 X 10^8 ufc/ml. Unas alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana se congelaron y se almacenaron a -40 °C hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de 106 ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando unas placas de polipropileno de 1 ml 96 de Deep-Well estériles. Unas diluciones en serie en dos veces de muestras de anticuerpo (50 µl) se prepararon, a lo que siguió la adición de 300 µl de tampón de ensayo a la mezcla de anticuerpos. Se añadieron bacterias (50 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos. La etapa de opsonización fue seguida por la adición de 50 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, se añadieron 50 µl de células efectoras (107 células/ml concentración) a la placa y la suspensión se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Una alícuota de 50 µl de la suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, mediante agitación con vórtex para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1 hora con un mezclado continuo usando un agitador de tipo bandeja giratoria. Al final de la incubación, una alícuota de 50 µl de suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtice para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la razón del número de ufc que

sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células efectoras con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células efectoras. Los controles con contenido en bacterias, complemento, y sueros se incluyeron para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la aglutinación.

Adsorción de complemento

[0178] El suero a partir de donantes humanos adsorbido frente a cepas de S. aureus PFESA0266, PFESA0286 y PFESA0270 puede usarse como una fuente de complemento en el ensayo. Se hizo que crecieran unas cepas de S. aureus durante la noche sobre placas de TSA a 37 °C. Las células se rasparon de la placa y volvieron a suspenderse en PBS estéril. Las células bacterianas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sedimento celular volvió a suspenderse en suero humano para su adsorción. El suero se incubó con bacterias en un Nutator a 4 °C durante 30 minutos. Las células se centrifugaron, el suero se transfirió a otro tubo con contenido en bacterias y la etapa de adsorción se repitió de nuevo durante 30 minutos. Por último, las células se centrifugaron y el suero se pasó a través de un filtro de 0,2 micrómetros antes de que 0,5 ml de alícuotas se congelaran en nitrógeno líquido.

Procedimiento II - OPA usando células HL-60

[0179] Las células HL-60 se diferenciaron de acuerdo con S. Romero-Steiner, y col., Clin Diagn Lab Immunol 4 (4) (1997), págs. 415 a 422. Las células HL-60 recolectadas volvieron a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado con contenido en un 1 % de albúmina de suero

bovino) a aproximadamente 108 células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que estuvieron listas para su uso. Se hizo que S. aureus creciera durante la noche sobre unas placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y volvieron a suspenderse en tampón de ensayo con un contenido de un 5 % de glicerol a una DO 600 = 1, lo que es igual a aproximadamente 5 X 10^8 ufc/ml. Unas alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana se congelaron y se almacenaron a -40 °C hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de 106 ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando unas placas de polipropileno de 1 ml 96 de Deep-Well estériles. Se prepararon unas diluciones en serie en dos veces de muestras de anticuerpo monoclonal (25 µl), a lo que siguió la adición de 150 µl de tampón de ensayo a la suspensión de anticuerpos. Se añadieron bacterias (25 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos seguido por la adición de 25 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, 25 µl de células HL-60 (107 células/ml) se añadieron a la placa y la suspensión se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Una alícuota de 25 µl de la suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtice para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1 hora con un mezclado continuo usando un agitador de tipo bandeja giratoria. Al final de la incubación, una alícuota de 25 µl de suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de

saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtice y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la razón del número de ufc que sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células HL-60. Los controles con contenido en bacterias, complemento y AcM se incluyeron para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la aglutinación.

[0180] Los siguientes ejemplos se prevén a modo de ilustración, no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus.

[0181] En el presente ejemplo, se describe la producción de varios intervalos de tamaño de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus. La estructura de la unidad de repetición de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus se muestra en la figura 1. Los procedimientos que se describen en el presente documento son eficaces para producir polisacárido capsular de serotipo 8 con pesos moleculares que varían de aproximadamente 20 kDa a 700 kDa. Mediante una selección apropiada de las condiciones, pueden aislarse y purificarse polisacáridos capsulares de serotipo 8 de alto peso molecular variando de 50 kDa a 700 kDa en peso molecular. Para su uso en composiciones inmunogénicas, el polisacárido capsular de serotipo 8 puede aislarse y purificarse variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular y muchos intervalos deseados. En base a las características de crecimiento y

a la cantidad de cápsula que se produce, se usaron unas cepas PFESA0005 o PFESA0286 para la producción de polisacárido capsular de serotipo 8. Las cápsulas aisladas a partir de las cepas PFESA0005 o PFESA0286 mostraron que eran idénticas.

[0182] Para la producción de polisacáridos capsulares de serotipo 8, se hizo que las cepas crecieran en un medio complejo que consistía principalmente en una fuente de carbono (o bien lactosa o bien sacarosa), harina de soja hidrolizada como la fuente de nitrógeno, y trazas de metales. Se hizo que las cepas crecieran en biorreactores durante de 2 a 5 días.

[0183] Antes del procesado en autoclave, una muestra se retiró para someter a prueba el nivel de la Enterotoxina estafilocócica B (SEB) en el cultivo. En presencia de un 0,05 % de Polysorbate 80, la concentración de SEB en la fermentación fue de 15 a 20 ng/ml. Experimentos previos mostraron que el procesado en autoclave del cultivo durante 1 hora redujo el nivel de SEB a menos de 0,1 ng/ml, que se encuentra por debajo del límite de detección para el kit TECRA.

[0184] Un polisacárido fraccionado en etanol, diafiltrado, se cargó en una columna Q-Sepharose AEC y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl tal como se describe anteriormente. Las fracciones se analizaron mediante el ensayo de O-Acetilo y una prueba de doble inmunodifusión para determinar la presencia de polisacárido de serotipo 5 y un ensayo de fosfato para determinar la presencia de ácido teicoico (TA). La presencia de polisacárido de serotipo 8 se detectó en las fracciones 35 a 95 (las figuras 2A y B).

[0185] Para reducir la contaminación con ácido teicoico, las fracciones 35 a 75 se agruparon y cualquier ácido teicoico residual se oxidó con

metaperyodato de sodio para permitir su eliminación mediante diafiltración de 3K frente a diH2O.

[0186] La purificación de polisacárido capsular de serotipo 8 que se usa para la preparación de conjugados se realizó mediante dos procedimientos diferentes que se basan en una temperatura elevada y en un pH bajo para afectar a la liberación de cápsula a partir de la célula y reducir el peso molecular del polisacárido. El peso molecular resultante dependía del momento, la temperatura y el pH de la etapa de hidrólisis.

[0187] La caracterización del polisacárido capsular de serotipo 8 se realizó usando las técnicas que se especifican en la tabla 1.

Tabla 1: Ensayos de caracterización para polisacáridos capsulares de serotipo 8 de S. aureus purificados.

Especificidad	Ensayo
Proteína residual	ensayo colorimétrico de Lowry
Ácidos nucleicos residuales	barrido de 260nm
Ácido teicoico residual	ensayo colorimétrico de fosfato
Peptidoglicano residual	HPAEC-PAD
Tamaño	SEC-MALLS
Composición	HPAEC-PAD
Identidad	1H-RMN o reacción con AcM específico
O-acetilación	1H-RMN
Concentración	MALLS-RI o HPAEC-PAD

[0188] Los polisacáridos de cápsula que se producen mediante los procedimientos que se describen a continuación dan como resultado unos

polisacáridos puros bien caracterizados con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico, peptidoglicano y ácido teicoico.

[0189] En el primer procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, la preparación se trató con un cóctel de enzimas (por ejemplo, ribonucleasa, desoxiribonucleasa, lisozima y proteasa) para digerir impurezas. Después de la incubación, las impurezas residuales se precipitan mediante la adición de etanol (concentración final de aproximadamente un 25 %). Después de la eliminación del etanol residual, una disolución con contenido en un polisacárido de cápsula se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y se eluyó con un gradiente de sal lineal. Las fracciones con contenido en polisacárido de cápsula se agruparon y se trataron con metaperyodato de sodio. Este tratamiento dio como resultado la hidrólisis oxidativa del contaminante de ácido teicoico residual, pero no afectó al polisacárido capsular de serotipo 8. La reacción se extinguió mediante la adición de etilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH2O para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0190] El segundo procedimiento se usó para producir polisacárido de cápsula sin el uso de enzimas para digerir las varias impurezas derivadas de célula. En el presente procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, el caldo de fermentación hidrolizado se clarificó por microfiltración seguida por ultrafiltración y diafiltración. La disolución se trató con carbono activado para eliminar impurezas. Después del tratamiento de carbono, el

material se trató con metaperyodato de sodio para oxidar el ácido teicoico residual seguido por una extinción con propilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH2O para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0191] Las preparaciones que se producen usando cualquiera de los procedimientos dieron como resultado unos polisacáridos capsulares puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico y ácido teicoico. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular deseados variando las condiciones de hidrólisis. En la tabla 2 a continuación se muestran unos ejemplos de polisacárido capsular que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Los lotes de polisacárido capsular de serotipo 8 purificado tenían una alta pureza tal como se indica por la ausencia de ácido teicoico (TA), peptidoglicano y proteína residual baja. Véase la tabla 2. El intervalo de pesos moleculares más bajos abarcaba de 20,4 kDa a 65,1 kDa, y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados (~100 %). Los niveles de contaminación de ácido nucleico eran bajos (de un 0,12 a un 2,45 %).

Tabla 2: Caracterización de las preparaciones de polisacárido capsular de serotipo 8.

Muestra	CP8 purificado total	MW	Proteína	Ácido Nuc.	O-Acetilo
	mg	(kDa) (g/mol)	(Lowry) % (p/p)	(barrido de 260 nm) % (p/p)	RMN %

1	310	27,0	1,2	0,94	100
2	438	29,0	2,4	2	100
3	179	20,4	0,37	0,12	108

[0192] Selección de peso molecular de los polisacáridos capsulares: Un análisis cinético mostró que un amplio intervalo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede generarse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Inicialmente, se produjeron unos polisacáridos más grandes mediante las células bacterianas, y posteriormente, un intervalo de peso molecular deseado puede seleccionarse y a continuación purificarse mediante la manipulación del pH y las condiciones de calor de las etapas de calentamiento y de hidrólisis.

[0193] El tratamiento térmico del caldo de fermentación de S. aureus es una etapa de procedimiento entre la fermentación y la recuperación de polisacárido capsular. Esta etapa de procedimiento usa calor para tratar el caldo de pH ajustado durante un periodo especificado. Los fines del tratamiento térmico a un pH bajo eran destruir células, inactivar enterotoxinas, liberar polisacárido unido a célula y reducir el peso molecular al tamaño deseado. Entre estos fines, la reducción de peso molecular era la menor en términos de tiempo de procesamiento requerido en esta etapa. Por lo tanto, los otros fines se lograron de forma inevitable dentro del plazo de tiempo del tratamiento considerado.

[0194] *Tratamiento térmico*: se determinaron las condiciones de pH y temperatura para seleccionar varios intervalos de peso molecular de los polisacáridos de cápsula. Se usó un fermentador Biolafitte de 15 l para estos estudios. El caldo de fermentación se transfirió al fermentador mediante una

bomba peristáltica. Usando una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm, el pH del caldo se ajustó con ácido sulfúrico concentrado. A continuación, la temperatura del caldo se elevó hasta el valor fijado. El tiempo de tratamiento térmico empezó en cuanto la temperatura alcanzó el punto fijado. Cuando se alcanzó el tiempo de tratamiento deseado, el caldo se enfrió hasta temperatura ambiente. Se tomaron muestras en procedimiento para determinar la concentración de polisacárido y el peso molecular mediante sistemas de HPLC y SEC-MALLS, respectivamente. Los datos del peso molecular (MW) se usaron en el análisis cinético. Los perfiles de MW se determinaron a lo largo del tiempo a un pH de 3,5, 4,0 y 5,0. Véase la figura 3A.

[0195] La cinética de hidrólisis ácida suave de polisacáridos se realizó usando polisacárido capsular de serotipo 8 purificado que se obtiene a partir del procedimiento. La disolución de polisacárido purificado se ajustó al pH deseado para el experimento con ácido sulfúrico. Aproximadamente 1,5 ml de la disolución se transfirió a cada uno de los tubos de centrífuga de 15 ml. Se colocaron los tubos en un baño de aceite equipado con un sistema de control de la temperatura de precisión. El tubo se sacó a un intervalo de tiempo predeterminado y se extinguió en un cubo de hielo. Al final del experimento, una alícuota de tampón Tris 1 M (pH 7,5) se añadió a la muestra para ajustar el pH de nuevo a aproximadamente 7. Las muestras se analizaron mediante un sistema SEC-MALLS. Los datos de MW se usaron en el análisis cinético. El efecto de la temperatura sobre el perfil de MW de CP8 a un pH de 3,5 se determinó a lo largo del tiempo. Véase la figura 3B.

Resultados

[0196] Tal como se muestra en la figura 3A, un pH más bajo era más eficaz para reducir el peso molecular del polisacárido. Pesos moleculares entre 300 kDa y 600 kDa pueden generarse usando un pH de 5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. De forma similar, pesos moleculares entre 250 kDa y 450 kDa pueden generarse usando un pH de 4 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. Además, pesos moleculares entre 120 kDa y 450 kDa pueden generarse usando un pH de 3,5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos.

[0197] Tal como se muestra en la figura 3B, cuanto más alta es la temperatura, más rápida es la velocidad de hidrólisis y más amplio es el intervalo de los pesos moleculares de polisacárido que se produce con el tiempo. El uso de una temperatura más baja, 55 °C frente a 95 °C al mismo pH, produce un intervalo más estrecho de pesos moleculares de polisacárido.

[0198] Además, la figura 4 muestra una correlación entre el peso molecular de CP8 purificado con el tiempo de tratamiento para hidrólisis ácida suave (pH 3,5 a 95 °C). El polisacárido purificado es el producto final que se obtiene a partir del procedimiento de recuperación detallado anteriormente. Como también se muestra en la figura 4, un aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa S. aureus PFESA0005 a un pH de 3,5 dio como resultado CP8 de peso molecular más bajo, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a un pH de 3,5 dieron como resultado CP8 de peso molecular más alto. El tamaño de los polisacáridos capsulares de serotipo 8 oscilaba de aproximadamente 80 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a un pH

de 3,5. La correlación entre el momento de tratamiento térmico a un pH bajo y el tamaño del CP8 purificado, tal como se muestra en la figura 4, permite una estimación del tiempo de tratamiento requerido para producir polisacárido purificado con un intervalo especificado de peso molecular.

[0199] Es importante indicar que tal como se muestra anteriormente el intervalo completo de pesos moleculares de polisacáridos capsulares de serotipo 8 de 20 kDa a más de 500 kDa puede producirse, liberarse y purificarse. Los procedimientos por lo tanto pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados tal como se muestra en la tabla 3. El intervalo relativamente estrecho de peso molecular de polisacárido que se produce cuando los pesos moleculares pico varían de 87 kDa a 108 kDa representa un intervalo bien caracterizado de pesos moleculares que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Un intervalo particularmente ventajoso de polisacáridos de alto peso molecular, variando de 70 kDa a 300 kDa o de 70 kDa a 150 kDa, es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando el polisacárido capsular con una proteína o molécula portadora (véase la tabla 3). Las condiciones que se usan para generar el polisacárido de cápsula CP8 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 80 a 120 kDa son tal como sigue: 95 °C, pH 3,5 durante 300 minutos.

Tabla 3: Producción de intervalo específico de polisacárido capsular de serotipo 8 de alto peso molecular.

	Polisacárido capsular de serotipo, 8
Pase	MW (kDa)

1	98
2	89
3	108
4	108
5	89
6	100
1	99
2	113
3	105
4	100
5	87

Ejemplo 2: Conjugación de polisacáridos capsulares de serotipo 8 con CRM_{197}.

[0200] El presente ejemplo describe procedimientos y ensayos de caracterización que se usan en la producción de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus-CRM_{197}. Se desarrollaron diferentes químicas de conjugación para conjugar polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus con esta proteína de portador. Por ejemplo, conjugación usando PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida) da como resultado un enlace tioéter covalente entre el CP y la proteína de portador. Alternativamente, conjugación usando CDI/CDT (1,1-carboildiimidazol/1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre CP y proteína de portador.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 con CRM_{197} mediante química de conjugación de PDPH.

[0201] La química de conjugación de PDPH es un procedimiento de múltiples etapas que implica la activación del polisacárido, la eliminación del grupo protector de tiol, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación de la proteína CRM_{197}, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. Después de la introducción de un grupo tiol con contenido en ligador en el polisacárido y un grupo haloacetilo en el portador de proteína CRM_{197}, el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus se unió al portador de proteína a través de un enlace tioéter. S introdujeron grupos bromoacetilo en la proteína CRM_{197} mediante reacción de grupos amina con el éster de N-hidroxisuccimida de ácido bromoacético. Para generar polisacárido tiolado, los grupos carboxilato activados de carbodiimida de ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido se acoplaron con el grupo hidrazida del ligador heterobifuncional de hidrazida reactiva-sulfhidrilo 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH). Los tioles de PDPH-polisacárido tiolado, generados mediante reducción con DTT y purificados mediante SEC en una columna Sephadex G25, reaccionaron con los grupos bromoacetilo de proteína activada dando como resultado enlace covalente de tioéter formado mediante desplazamiento de bromo entre polisacárido y la proteína de portador. Los grupos bromoacetilo sin reaccionar se "taparon" con clorhidrato de cisteamina (clorhidrato de 2-aminoetanotiol). La mezcla de reacción se concentró a continuación y se sometió a diafriltración. Los grupos bromoacetilo no conjugados restantes se taparon con clorhidrato de

cisteamina para garantizar que no quedaba ningún grupo bromoacetilo reactivo tras la conjugación. Éste formó un enlace covalente entre el extremo de tiol de cisteamina y el grupo acetilo en el residuo de lisina tras el desplazamiento de bromo.

[0202] *1. Tiolación de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus con PDPH*: El polisacárido se activó en primer lugar mediante tiolación con PDPH. Se mezcló el polisacárido con una disolución madre de PDPH recién preparada (250 mg/ml en DMSO), una disolución madre de EDAC (90 mg/ml en diH2O), y disolución madre de tampón MES (0,5 M, pH 4,85) para fabricar la disolución final 0,1 M de MES, y 2 y 4 mg de polisacárido/ml mientras se mantiene una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de 1:0,6:1,25 para polisacárido capsular de serotipo 8. Se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se dializó frente a un volumen 1000Xde H2O destilada cuatro veces usando un dispositivo de diálisis 3500 MWCO a entre 4 °C y 8 °C para eliminar PDPH sin reaccionar. El polisacárido unido a PDPH se hizo DTT 0,2 M y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o durante la noche a entre 4 °C y 8 °C. Se separaron el DTT en exceso así como los productos secundarios de la reacción del sacárido activado mediante SEC usando resina Sephadex G25 y agua destilada como la fase móvil. Las fracciones se sometieron a ensayo mediante el ensayo de DTDP para grupos tiol y se agruparon las fracciones positivas que eluían cerca del volumen vacío de la columna. Se sometió a ensayo el conjunto de fracciones mediante los ensayos de PAHBAH y de O-acetilo para determinar el grado de activación que se expresa como un porcentaje molar de las unidades de repetición con contenido en un grupo

tiol (concentración molar de tioles/concentración molar de las unidades de repetición). Se liofilizó el polisacárido activado y se almacenó a -25 ºC hasta que era necesario para la conjugación.

[0203] Los resultados de la reproducibilidad de la tiolación del polisacárido de serotipo 8 con PDPH se muestran en la tabla 4. El grado de activación de polisacárido de serotipo 8 estaba en el intervalo de un 12 % a un 16 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de polisacárido capsular frente a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Tabla 4: Activación de polisacárido capsular de serotipo 8 con PDPH - Estudio de reproducibilidad.

Polisacárido de serotipo 8-PDPH	Activación (% de MSH/MRU)	Escala, mg	Rendimiento, mg (%, p/p)
1	14	36	30 (83)
2	16	30	27 (91)
4	16	38	42 (110)
5	12	40	44 (110)

[0204] *2. Activación de proteína de portador*: Por separado, se activó la proteína de portador mediante bromoacetilación. CRM_{197} se diluyó hasta 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM pH 7 (PBS) y a continuación se hizo NaHCO3 0,1 M pH 7,0 usando disolución madre 1 M. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS) se añadió a una razón CRM_{197} :BAANS 1:0,25 (p:p) usando una disolución madre de BAANS de DMSO 20 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a entre 4 y

8 ºC durante 1 hora a continuación se purificó usando SEC sobre Sephadex G-25. El CRM_{197} activado purificado se sometió a ensayo mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y a continuación se diluyó con PBS hasta 5 mg/ml. Se añadió sacarosa a un 5 % p/vol como un crioprotector y se congeló la proteína activada y se almacenó a -25 ºC hasta que era necesaria para la conjugación.

[0205] La bromoacetilación de residuos de lisina de CRM_{197} fue muy consistente, dando como resultado la activación de 19 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles (véase la tabla 5). La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Tabla 5: Rendimientos y grado de Bromoacetilación de CRM_{197}.

Preparación	Lisinas Activadas (n =)	Escala (mg)	Rendimiento (% p/p)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

[0206] *3. Coupling Reacción*: Una vez se prepararon el polisacárido de cápsula activado y la proteína de portador activada, se combinaron los dos en una reacción de conjugación. Se disolvió el polisacárido tiolado y liofilizado en borato 0,16 M pH 8,95, se mezcló CRM_{197} bromoacetilado descongelado y agua destilada para fabricar la disolución final de borato 0,1 M, razón 1:1 en p/p de CRM_{197}:polisacárido, y polisacárido 1 mg/ml. Se

incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante entre 16 y 24 horas. Se taparon los grupos bromoacetilo sin reaccionar en la proteína añadiendo clorhidrato de cisteamina en una razón de CRM_{197}:cisteamina de 1:2 (p/p) usando una disolución 135 mg/ml de cisteamina disuelta en borato 0,1 M pH 8,95 y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. El conjugado de polisacárido de cápsula-CRM_{197} (conjugado) se purificó mediante diafiltración 50 veces frente a NaCl al 0,9 % usando un ultrafiltro de polietersulfona de 100K.

[0207] Los resultados de la reproducibilidad de estudios de tiocilación de polisacárido capsular de serotipo 8 con PDPH mostraron que el grado de activación del polisacárido estaba en el intervalo de un 12 % a un 16 % lo que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de polisacárido frente a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 con CRM_{197} mediante química de conjugación de CDI/CDT.

[0208] CDI y CDT proporcionan un procedimiento de conjugación de una sola etapa en el que el polisacárido se activa en un entorno anhidro (DMSO) para formar imidazol o restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición de un portador de proteína (en DMSO) conduce al desplazamiento nucleofílico del imidazol o triazol mediante lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados).

[0209] Las químicas de conjugación tanto de CDI como CDT producían un polisacárido capsular de serotipo 8 con enlace covalente con la proteína de portador, que se indicaba por la presencia del sacárido y la proteína en las fracciones en cromatografía de exlusión molecular, y mediante análisis de aminoácidos de conjugado de clorhidrato de cisteamina tapado o glicolaldehído tapado.

[0210] El resumen de los resultados de la preparación de varios lotes de conjugados preparados mediante químicas tanto de PDPH como de CDI/CDT para el serotipo 8 capsular con tamaño de polisacárido en el intervalo de 20 kDa a 40 kDa se muestra en la tabla 6 a continuación. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos de conjugación. La antigenicidad de polisacárido conjugado capsular de serotipo 8 no se vio alterada por la conjugación tal como se representa mediante la línea de precipitinas de identidad entre conjugados y polisacárido nativo.

Tabla 6: Caracterización del polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} preparado mediante dos químicas de conjugación.

Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Razón de rendimiento	Libre azúcar (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificad
CDI/CDT	46-62	54-55	0,8-0,9	22-25	< 1	7-8
PDPH	34-70	61-83	0,6-0,9	15-41	ND	11-16

[0211] Tal como se muestra anteriormente, los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. Se buscaba preparar conjugados a partir de un intervalo preseleccionado de alto peso molecular que pudiera ser polisacárido capsular de serotipo 8 purificado y filtrado para su uso en composiciones inmunogénicas. La tabla 7 resume el análisis de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 en los que el peso molecular del polisacárido de cápsula de serotipo 8 oscilaba de aproximadamente 80 kDa a 120 kDa y se utilizó la química de conjugación de imidazol. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 595 kDa a 1.708 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM_{197} oscilaba de un número alto de 9 a un número bajo de 3. El polisacárido de cápsula libre oscilaba de un número alto de un 6 % a un número bajo de un 2 %.

Tabla 7: Conjugados con intervalo de peso molecular preseleccionado de polisacárido capsular de serotipo 8.

Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento (%)	Sac. libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas modificadas
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

217

[0212] Ambas químicas de conjugación producen un polisacárido capsular de serotipo 8 con enlace covalente con la proteína de portador. No hubo diferencias significativas en polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido capsular de serotipo 8-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

Ejemplo 3: Procedimiento en un solo recipiente frente a procedimiento de CDI/CDT complejo.

[0213] Tal como se describe anteriormente, los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDI (1,1-carbonildiimidazol), CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida). El uso de CDI/CDT da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador, mientras que el uso de PDPH da como resultado un enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

[0214] El procedimiento basado en PDPH era un procedimiento de múltiples etapas que implicaba la activación del polisacárido, la eliminación de un grupo protector de tiol en el polisacárido, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación del portador de proteína, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. En el presente procedimiento, se hicieron reaccionar polisacáridos capsulares de serotipo 8 de S. aureus con PDPH y una carbodiimida en una disolución acuosa tal como MES 0,1 M para

producir polisacáridos unidos a PDPH. Los polisacáridos unidos a PDPH se hicieron reaccionar con un agente reductor para producir polisacáridos activados que se purificaron a continuación. Proteínas de portador se hicieron reaccionar con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético en una disolución acuosa para producir proteínas portadoras activadas que se purificaron a continuación. Los polisacáridos de serotipo 8 activados purificados se hicieron reaccionar a continuación con las proteínas portadoras activadas purificadas para producir conjugados de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador.

[0215] Por el contrario, los procedimientos basados en CDI- y CDT eran procedimientos de conjugación de una o dos etapas, en los que polisacárido capsular se activaba en un entorno anhidro (es decir, DMSO) para formar imidazol o restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición del portador de proteína (en DMSO) condujo a un desplazamiento nucleofílico del imidazol o triazol mediante lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Por consiguiente, se desarrollaron dos procedimientos basados en CDI- o CDT: un procedimiento más complejo y un procedimiento en un solo recipiente más sencillo. En el procedimiento más complejo, se combinaron polisacáridos capsulares de serotipo 8 de S. aureus con imidazol o triazol, se liofilizaron, y a continuación se hicieron reaccionar con CDI o CDT en un disolvente orgánico (tal como DMSO) para producir polisacáridos de serotipo 8 activados. Los polisacáridos de serotipo 8 activados se purificaron y a continuación se hicieron reaccionar con

proteínas portadoras en el disolvente orgánico para producir conjugados de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador. El procedimiento en un solo recipiente era similar al procedimiento complejo excepto en que los polisacáridos de serotipo 8 activados no se purificaban antes de la reacción con proteínas portadoras.

Procedimiento complejo de CDI/CDT.

[0216] *Activación de polisacárido*: Se mezcló polisacárido de serotipo 8 con 10 g de triazol/g de serotipo 8 y se liofilizó. Se disolvió la torta resultante en DMSO a 2,0 mg de polisacárido de serotipo 8/ml. Se determinó el contenido en agua. Una disolución recién preparada de CDT a 100 mg/ml en DMSO se añadió hasta conseguir una cantidad molar de CDT equivalente al agua. Alternativamente, la cantidad de CDT que se añade puede ajustarse para obtener un grado de activación más alto o más bajo. Esto se mantuvo 30 minutos a 23 ºC.

[0217] *Purificación de polisacárido de serotipo 8 activado*: La disolución de serotipo 8 activado (ACP8) se vertió en 25 volúmenes de agua para destruir el CDT en exceso. Ésta se concentró hasta su volumen original sobre una membrana de PES de 10 kDa a aproximadamente 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a agua para al menos 10 volúmenes. Esta etapa se completó en menos de 4 horas. Se mezcló el material diafiltrado con 10 g de triazol/g de polisacárido de serotipo 8 original y se liofilizó.

[0218] *Preparación de CRM liofilizado*: CRM se sometió a diafiltración frente a NaCl al 0,4 %/sacarosa al 5 % a volumen constante sobre una membrana de PES de 10 kDa para al menos 10 volúmenes. La concentración de proteína se determinó y se añadió suficiente tampón de diafiltración para

llevar la concentración de proteína hasta 5,0 g/l, proporcionando de este modo una razón en p/p de NaCl/CRM = 0,8. Se liofilizó el CRM.

[0219] *Conjugación*: Polisacárido de serotipo 8 diafiltrado, activado, se disolvió en DMSO a 1 mg/ml. Disolución de borato a 100 mM se añadió para conseguir un 2 % v/v.

[0220] CRM volvió a suspenderse a 2 mg/ml y, cuando se completó la disolución, se combinó con la disolución de ACP8. Ésta se dejó reaccionar a 23 °C durante 20 horas.

[0221] Se vertió la reacción de conjugado en 24 volúmenes de borato 5 mM pH 9,0 y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se ajustó a pH 7,5 con tampón fosfato 0,5 M, pH 6,5. Ésta se filtró a través de un filtro de 5 micrómetros y se concentró hasta el volumen original sobre una membrana de PES de 300 kDa a una carga de ~ 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a al menos 10 volúmenes de agua. El concentrado resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

Procedimiento en un solo recipiente de CDI/CDT.

[0222] *Intercambio de matriz de CRM_{197}*: CRM_{197} se sometió a diafiltración para intercambiar de la matriz voluminosa de aproximadamente 10 mM fosfato/NaCl 80 mM/sacarosa al 15 %, pH de 7 a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %/ octil-β-D-glucósido 15 mM, pH 7. El intercambio permitió la eliminación de fosfato y sacarosa que son perjudiciales para la conjugación y define el contenido en cloruro de sodio portado en la conjugación. Se añade octil-β-D-glucopiranósido para prevenir la formación de partículas tras la filtración estéril.

219

[0223] La matriz de la CRM_{197} se intercambió mediante filtración de flujo tangencial frente a imidazol 5 mM/0,72 %/octil-B-D-glucopiranósido 15 mM pH 7 a través de 10 diavolúmenes usando membranas de PES de MWCO de 10K a una concentración de retentato de aproximadamente 4 mg/ml. La exposición de membrana típica era de 2 gramos/ft2 y la concentración de CRM_{197} final diana en la matriz fue de 6 mg/ml. La CRM_{197} se almacenó a 2 ºC-8 ºC.

[0224] *Activación/Conjugación*: El procedimiento de activación/conjugación para polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus consistió en las siguientes etapas: 1) Intercambio de matriz de la CRM_{197}; 2) Combinación del polisacárido; 3) Congelación superficial y liofilización de CRM_{197} y polisacárido combinado; 4) Disolución del polisacárido liofilizado y CRM_{197}; 5) Activación del polisacárido; 6) Conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}; y 7) Purificación del conjugado (dilución, diafiltración, filtración estéril).

[0225] El polisacárido se combinó con 10 gramos de excipiente de 1,2,4-triazol por gramo de polisacárido. El excipiente se añadió como un polvo al polisacárido, con una disolución que se obtiene tras menos de 15 minutos de mezclado a temperatura ambiente.

[0226] El polisacárido combinado y CRM_{197} se congelaron superficialmente por separado usando un baño de etanol a -75 ºC. El volumen por frasco de 1 l era de aproximadamente 500 ml.

[0227] Para la disolución de polisacárido, Se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales del polisacárido para obtener una suspensión y a continuación se transfirió al recipiente de reacción de activación/conjugación

para calentar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Se obtuvo una disolución transparente a medida que la suspensión alcanzaba aproximadamente 45 °C con mezclado. La disolución se enfrió a continuación hasta 23 °C + 2 °C.

[0228] Para la disolución de CRM_{197}, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales con contenido en CRM_{197} para obtener una suspensión y a continuación se transfirió a un segundo recipiente para mezclar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Habitualmente se obtuvo una disolución transparente en menos de 15 minutos.

[0229] La disolución de polisacárido/DMSO se muestreó por el análisis de Karl Fischer para determinar el contenido en humedad. CDT se preparó como una disolución 100 mg/ml en DMSO y se añadió en base al contenido en humedad determinado. La adicón continua de la disolución de CDT se realizó a lo largo de aproximadamente 5 minutos a 23 °C + 2 °C con mezclado. Se dejó avanzar la reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C + 2 °C. La reacción se muestreó para determinar el nivel de activación (UV 220/205 nm) y a continuación se añadió borato de sodio 100 mM, pH 9 hasta obtener una disolución acuosa al 1,5 %. A continuación se agitó la disolución de reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C + 2 °C.

[0230] Para la conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}, se añadió DMSO hasta obtener una concentración de reacción de 0,8 mg/ml. el CRM_{197} disuelto en DMSO se añadió a continuación a la disolución de polisacárido activado con mezclado. Se agitó la reacción durante un mínimo de 4 horas a 23 °C + 2 °C.

220

[0231] La reacción disolución se diluyó 10X mediante su adición en tetraborato de sodio 5 mM , pH 9 con mezclado para hidrolizar grupos residuales de activación. La disolución diluida se pasó a través de un filtro de 5 µm y se concentró hasta una concentración de retentato diana de 2 g/l. Filtración de flujo tangencial se realizó usando membranas de celulosa regeneradas de 300K a través de 20 diavolúmenes con succinato 5 mM, pH 7. La exposición de membrana típica era de 1 gramo/ft2. El conjugado purificado se pasó a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 ºC-8 ºC.

Ejemplo 4: Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 usando El procedimiento de conjugación en un solo recipiente y complejo.

[0232] El presente ejemplo muestra que el intervalo preseleccionado de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede usarse para conjugación o bien en el procedimiento en un solo recipiente o bien complejo. Los polisacáridos más grandes se producen inicialmente por las células bacterianas, y el intervalo de peso molecular purificado resultante puede controlarse mediante el pH y el calor del procedimiento de hidrólisis en el ejemplo 1 (tal como se muestra en la tabla 3).

[0233] En el presente ejemplo, ocho lotes en los que el peso molecular del polisacárido de cápsula de serotipo 8 oscilaba de aproximadamente 80 kDa a aproximadamente 120 kDa se seleccionaron y se realizó la conjugación usando activación con 1,1-carbonil-di-(1,2,4-triazol) para polisacárido capsular de serotipo 8. Véase la tabla 8. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 595 kDa a 1.708 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM oscilaba de un número alto de 13 a un número

bajo de 3. El azúcar libre oscilaba de un alto número de un 11 % a un bajo número de un 1 %.

Tabla 8: Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 preparados con polisacáridos capsulares de 80 kDa a 120 kDa.

Procedimiento	Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento de sac.(%)	Azúcar libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas
En un solo recipiente	1	98	86	1	751	11
	2	89	80	1	675	13
	3	108	76	4	1.073	5,0
	4	108	69	4	819	5,2
	5	89	85,1	8	1.708	10
	6	100	94,0	11	1.577	5
Complejo	1	99	88	6	943	4
	2	113	73	5	841	3
	3	105	79	3	719	7
	4	100	86	2	630	9
	5	87	90	3	595	6

Ejemplo 5: Evaluación del polisacárido capsular de serotipo 8 tratado con base y nativo conjugado en un modelo de bacteriemia murino.

[0234] La importancia de los grupos O-acetilo presentes en polisacárido capsular de serotipo 8 nativo se evaluó antes de la conjugación para

inducción de respuestas de anticuerpos funcionales para polisacárido capsular conjugados. El polisacárido capsular de serotipo 8 se O-desacetiló en condiciones básicas suaves, y tanto RMN como cromatografía iónica (CI) confirmaron la ausencia de O-acetilación en polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM. El conjugado de CP8 des-O-Ac-CRM se preparó mediante conjugación de polisacárido CP8 des-O-Ac con CRM mediante química de PDPH tal como se describe en el ejemplo 2.

[0235] El polisacárido capsular de serotipo 8 conjugado inesperadamente no mostró grupos acetilo medibles mediante el procedimiento de CI. Esto podría atribuirse a diferencias en la estructura, sitios de O-acetilación en comparación con otros polisacáridos capsulares de S. aureus, que a su vez podrían provocar la eliminación o modification de los grupos acetilo en polisacáridos capsulares de serotipo 8 durante la conjugación.

[0236] El modelo de bacteriemia murino se usó para evaluar la eficacia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo frente a tradao con base conjugado con CRM_{197}. Grupos de ratones BALB/c hembra (15/grupo) se vacunaron en las semanas 0, 3 y 6 con 1 mcg de polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM o 1 µg de polisacárido capsular de serotipo 8 O-Ac-CRM. Las vacunas se formularon con 22 mcg de AlPO4. Los animales se expusieron a S. aureus PFESA0003, y se contaron las bacterias de la sangre tres horas más tarde. Los datos mostraron que no había una reducción estadísticamente significativa ($p = 0,0362$) en ufc bacterianas recuperadas de la sangre de animales inmunizados con conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo sin tratar tal como se determina mediante la prueba de la t .de Student (Tabla 9). En animales que se

inmunizaron con conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 tratado con base, las ufc bacterianas recuperadas de sangre fueron similares al grupo de control de solución salina.

Tabla 9: El conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} reduce la bacteriemia causada por S. aureus PFESA0003 en ratones.

Antígeno	Cepa/Dosis	LogUFC/Sangre	Significación (valor p)
Solución salina		4,35	
CP8 des-O-Ac-CRM	PFESA0003 1,14 x 108	4,45	
CP8 O-Ac-CRM		3,93	0,03

Ejemplo 6: Evaluación del polisacárido capsular de serotipo 8 nativo y tratado con base conjugado tratado en un modelo de bacteriemia murino.

[0237] Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 se evaluaron para determinar su capacidad para proteger a ratones en un modelo de pielonefritis. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición a S. aureus i.p. se redujeron significativamente en comparación con controles inmunizados con PBS.

[0238] Se llevaron a cabo dos estudios para evaluar la eficacia de conjugado de CP8-CRM_{197} en el modelo de bacteriemia murino, que se describe anteriormente, después de una exposición a S. aureus PFESA0268 (tipo 8). El primer estudio (figura 5) mostró una reducción significativa de bacteriemia ($p = 0,0308$). Para el estudio, grupos de ratones 6 a 8 Swiss Webster de 6 a 8 semanas de edad ($n = 30$) se inmunizaron de forma activa mediante

inyección subcutánea con 1 µg de polisacárido capsular de serotipo 8-CRM_{197} y solución salina ambos formulados con 100 µg de AlPO4 a 0, 2 y 4 semanas y se exponen en la semana 6 por la vía intravenosa a S. aureus PFESA0268 (tipo 8). Antes de la exposición se realizaron experimentos para optimizar la dosis de cepa de exposición at the age ratones reach after tres vacunacións. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia se llevó a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

Ejemplo 7: Actividad opsónica de sueros de ratones inmunizados con Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 8 nativos y modificados químicamente.

[0239] Sueros de ratón seleccionados (n = 5) con altos títulos de polisacárido capsular de serotipo 8 de un estudio de vacunación se compararon para determinar la actividad opsónica usando la cepa PFESA0005. Los resultados de OPA (tabla 10) muestran que sólo conjugados preparados mediante la conjugación de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo provocaba anticuerpos opsónicos en ratones. Cabe destacar que el conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 des-OAc era inmunogénico en ratones but los anticuerpos provocados no eran opsónicos en este ensayo. Los títulos de OPA se notifican como la inversa de la dilución a la que se observó una destrucción del 40 %.

Tabla 10: Actividad opsónica de sueros de ratón inmunizados con polisacárido capsular de serotipo 8 nativo frente a Polisacárido capsular de serotipo 8 des-O-Ac-CRM.

Polisacárido capsular de serotipo 8 Des-O-Ac-CRM	**Polisacárido capsular de serotipo 8-CRM**

título de OP Sem. 0 sueros	título de OP Sem. 8 sueros	título de OP Sem. 0 sueros	título de OP Sem. 8 sueros
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Ejemplo 8: La destrucción de cepas de S. aureus por antisueros de conjugado de serotipo 8 puede inhibirse mediante la adición de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo.

[0240] Para confirmar la especificidad de la destrucción, se realizó el enayo opsonofagocítico en presencia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo o polisacárido neumocócico no relacionado (Pn 14 poli), esencialmente tal como se describe anteriormente.

[0241] Los resultados (tabla 11) mostraron que la presencia de polisacárido capsular de serotipo 8 nativo en mezcla de reacción inhibía la destrucción opsonofagocítica de PFESA0286 de S. aureus (tipo 8). Estos resultados confirman que la destrucción opsonofagocítica mediante sueros inmunitarios está mediada por anticuerpos específicos de cápsula.

Tabla 11: Adición Polisacárido capsular de serotipo 8 Inhibits Destrucción opsonofagocítica de S. aureus mediante sueros inmunitarios.

Mono	Muestra de sueros	Título de OPA
	Sem. 0	< 50
02D133	Sem. 8	4.050
	Sem. 0 + 20 µg CP8 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg CP8 poli	< 50

	Sem. 0 + 20 µg Pn14 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg Pn 14 poli	4.050
	Sem. 0	< 50
A4N122	Sem. 8	4.050
	Sem. 0 + 20 µg CP8 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg CP8 poli	< 50
	Sem. 0 + 20 µg Pn14 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg Pn 14 poli	1.350

RESUMEN

[0242] Todas las químicas de conjugación produjeron polisacárido capsular de serotipo 8 con enlace covalente con la proteína de portador CRM_{197}. No hubo diferencias significativas en sacárido libre, razón de polisacárido capsular de serotipo 8-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos procedimientos.

Ejemplo 9: Preparación de polisacárido capsular de serotipo 5 de S.aureus.

[0243] En el presente ejemplo, se describe la producción de varios intervalos de tamaño de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus. La estructura de la unidad de repetición de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus se muestra en la figura 6. Los procedimientos que se describen en el presente documento son eficaces para producir polisacárido capsular de serotipo 5 con pesos moleculares que varían de aproximadamente 20 kDa a 800 kDa. Mediante una selección apropiada de las condiciones, pueden aislarse y purificarse polisacáridos capsulares de serotipo 5 de alto peso

molecular variando de 50 kDa a 800 kDa en peso molecular. Para su uso en composiciones inmunogénicas, puede aislarse y purificarse polisacárido capsular de serotipo 5 variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular, de 70 kDa a 150 kDa y muchos otros intervalos deseados. La cepa PFESA0266 see seleccionó para la producción de polisacárido capsular de serotipo 5 en base a las características de crecimiento y a la cantidad de cápsula que se produce.

[0244] Para la producción de polisacárido capsular de serotipo 5, se hizo que la cepa PFESA0266 creciera en un medio complejo que consiste principalmente en una fuente de carbono (o bien lactosa o bien sacarosa), harina de soja hidrolizada como la fuente de nitrógeno, y trazas de metales. Se hizo que la cepa creciera en biorreactores durante de 2 a 5 días.

[0245] La fermentación de la cepa PFESA0266 se llevó a cabo tal como se detalló anteriormente. En el momento de la recogida, la DO 600 del cultivo era de 7,38. El cultivo se trató en autoclave durante 1 hora y tras enfriar, se procesó el cultivo tal como se describe anteriormente para separar las células del material sobrenadante. Se recuperó aproximadamente 1 l de cada uno de las céluas y del sobrenadante filtrado y concentrado.

[0246] Antes del procesado en autoclave, una muestra se retiró para someter a prueba el nivel de la enterotoxina estafilocócica B (SEB) en el cultivo. En presencia de un 0,05 % de Polysorbate 80, la concentración de SEB en la fermentación fue de 15 a 20 ng/ml. Experimentos previos mostraron que el procesado en autoclave del cultivo durante 1 hora redujo el nivel de SEB a menos de 0,1 ng/ml, que se encuentra por debajo del límite de detección para el kit TECRA.

[0247] Un polisacárido fraccionado en etanol, diafiltrado, se cargó en una columna Q-Sepharose AEC y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl tal como se describe anteriormente. Las fracciones se analizaron mediante el ensayo de O-Acetilo y una prueba de doble inmunodifusión para determinar la presencia de polisacárido de serotipo 5 y un ensayo de fosfato para determinar la presencia de ácido teicoico. La presencia de polisacárido de serotipo 5 se detectó en las fracciones 60 a 105 (figuras 7A y B). Para reducir la contaminación con ácido teicoico, las fracciones 60 a 85 se agruparon y cualquier ácido teicoico residual se oxidó con metaperyodato de sodio para permitir su eliminación mediante diafiltración de 3K frente a diH2O.

[0248] La purificación de polisacárido capsular de serotipo 5 que se usa para la preparación de conjugados se realizó mediante dos procedimientos diferentes que se basan en una temperatura elevada y en un pH bajo para afectar a la liberación de cápsula a partir de la célula y reducir el peso molecular del polisacárido. El peso molecular resultante dependía del momento, la temperatura y el pH de la etapa de hidrólisis.

[0249] La caracterización del polisacárido capsular de serotipo 5 se realizó usando las técnicas que se especifican en la tabla 1, citado anteriormente.

[0250] Los polisacáridos de cápsula que se producen mediante los procedimientos que se describen a continuación dan como resultado polisacáridos puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico, peptidoglicano y ácido teicoico.

[0251] En el primer procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso

molecular, la preparación se trató con un cóctel de enzimas (por ejemplo, ribonucleasa, desoxiribonucleasa, lisozima y proteasa) para digerir impurezas. Después de la incubación, las impurezas residuales se precipitaron mediante la adición de etanol (concentración final de aproximadamente un 25 %). Después de la eliminación del etanol residual, una disolución con contenido en un polisacárido de cápsula se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y se eluyó con un gradiente de sal lineal. Las fracciones con contenido en polisacárido de cápsula se agruparon y se trataron con metaperyodato de sodio. Este tratamiento dio como resultado la hidrólisis oxidativa del contaminante de ácido teicoico residual, pero no afectó al polisacárido capsular de serotipo 5. La reacción se extinguió mediante la adición de etilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a agua destilada (dH20) para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0252] El segundo procedimiento se usó para producir polisacárido de cápsula sin el uso de enzimas para digerir las varias impurezas derivadas de célula. En el presente procedimiento, a continuación de la liberación del polisacárido de cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, el caldo de fermentación hidrolizado se clarificó por microfiltración seguida por ultrafiltración y diafiltración. La disolución se trató con carbono activado para eliminar impurezas. Después del tratamiento de carbono, el material se trató con metaperyodato de sodio para oxidar el ácido teicoico residual seguido por una extinción con propilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH2O para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0253] Las preparaciones que se producen usando cualquiera de los procedimientos dieron como resultado unos polisacáridos capsulares puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico y ácido teicoico. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular deseados manipulando las condiciones de hidrólisis.

[0254] Ejemplos de polisacárido capsular que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento se muestran en la tabla 12 a continuación. Los lotes de polisacárido capsular de serotipo 5 purificado tenían una alta pureza tal como se indica por la ausencia de ácido teicoico (TA), peptidoglicano y proteína residual baja. Véanse las tablas 12 y 13. El intervalo de pesos moleculares abarcaba de 132,7 kDa a 800 kDa y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados, variando de un 90 % a un 100 %, y estaban un 100 % N-acetilados.

Los rendimientos de la purificación del polisacárido capsular de serotipo 5 eran de un 39 % a un 63 %, y el tamaño de polisacárido purificado de serotipo 5 variaba de 35 kDa a 65 kDa (véase la tabla 12). El nivel de contaminación por ácido teicoico (TA) era aceptable y los niveles de proteínas residuales y ácido nucleico estaban también en intervalos aceptables. Espectros de RMN de polisacárido de serotipo 5 eran idénticos a los notificados en la bibliografía.

Tabla 12: Caracterización de polisacárido capsular de serotipo 5.

Muestra	CP5 total purificado	Rendimiento	MW	Proteína	Ácido Nuc.	O-acetilo
	mg	%	(kDa)	% (p/p)	(barrido	RMN

			(g/mol)		de 260 nm) % (p/p)	(%)
1	101	39	47	0	0,5	94
2	91	48	65	1,2	2,5	96
3	578	63	35	2,5	0,7	75

Tabla 13: Caracterización de polisacárido capsular de serotipo 5 adicional.

Muestra	MW (kDa)	CP5 (mg/ml)	RMN de O-acetilo (%)	Identidad según RMN	RMN de N-acetilo (%)
1	800,1	3,164	100	Pasa	100
2	132,7	1,172	90	Pasa	100
3	335,4	0,975	90	Pasa	100
4	366,8	0,865	90	Pasa	ND

ND = no detectado

[0255] *Selección de peso molecular de los polisacáridos capsulares*: Un análisis cinético mostró que un amplio intervalo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede generarse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Inicialmente, se produjeron unos polisacáridos más grandes mediante las células bacterianas, y posteriormente, un intervalo de peso molecular deseado puede seleccionarse y a continuación purificarse mediante la manipulación del pH y las condiciones de calor de las etapas de calentamiento y de hidrólisis.

[0256] El tratamiento térmico del caldo de fermentación de S. aureus es una etapa de procedimiento entre la fermentación y la recuperación de

226

polisacárido capsular. Esta etapa de procedimiento usa calor para tratar el caldo de pH ajustado durante un periodo especificado. Los fines del tratamiento térmico a un pH bajo eran destruir células, inactivar enterotoxinas, liberar polisacárido unido a célula y reducir el peso molecular al tamaño deseado. Entre estos fines, la reducción de peso molecular era la menor en términos de tiempo de procesamiento requerido en esta etapa. Por lo tanto, los otros fines se lograron de forma inevitable dentro del plazo de tiempo del tratamiento considerado.

[0257] *Tratamiento térmico*: se determinaron condiciones de pH y temperatura para seleccionar varios intervalos de peso molecular de los polisacáridos de cápsula. Se usó un fermentador Biolafitte de 15 l para estos estudios. El caldo de fermentación se transfirió al fermentador mediante una bomba peristáltica. Usando una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm, el pH del caldo se ajustó con ácido sulfúrico concentrado. A continuación, la temperatura del caldo se elevó hasta el valor fijado. El tiempo de tratamiento térmico empezó en cuanto la temperatura alcanzó el punto fijado. Cuando se alcanzó el tiempo de tratamiento deseado, el caldo se enfrió hasta temperatura ambiente. Se tomaron muestras en procedimiento para determinar la concentración de polisacárido y el peso molecular mediante sistemas de HPLC y SEC-MALLS, respectivamente. Los datos del peso molecular (MW) se usaron en el análisis cinético. Los perfiles de MW se determinaron a lo largo del tiempo a un pH de 3,5, 4,0 y 5,0. Véase la figura 8A.

[0258] La cinética de hidrólisis ácida suave de polisacáridos se realizó usando polisacárido capsular de serotipo 8 purificado que se obtiene a partir

del procedimiento. La disolución de polisacárido purificado se ajustó al pH deseado para el experimento con ácido sulfúrico. Aproximadamente 1,5 ml de la disolución se transfirió a cada uno de los tubos de centrífuga de 15 ml. Se colocaron los tubos en un baño de aceite equipado con un sistema de control de la temperatura de precisión. The tubos se sacaron a intervalos de tiempo predeterminados y se extinguieron en un cubo de hielo. Al final del experimento, una alícuota de tampón Tris 1 M (pH 7,5) se añadió a la muestra para ajustar el pH de nuevo a aproximadamente 7. Las muestras se analizaron mediante un sistema SEC-MALLS. Los datos de MW se usaron en el análisis cinético. El efecto de la temperatura sobre el perfil de MW de CP5 a un pH de 4,5 se determinó a lo largo del tiempo. Véase la figura 8B.

Resultados

[0259] Tal como se muestra en la figura 8A, un pH más bajo era más eficaz para reducir el peso molecular del polisacárido. En el presente ejemplo, intervalos de pesos moleculares entre aproximadamente 300 kDa y aproximadamente 600 kDa pueden generarse usando un pH de 5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. Véase la figura 8A. De forma similar, elegir un pH de 4,5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede proporcionar intervalos de peso molecular de polisacárido entre 200 kDa y 400 kDa. Además, elegir un pH de 4,0 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede proporcionar intervalos de peso molecular de polisacárido entre 120 kDa y 300 kDa.

[0260] Tal como se muestra en la figura 8B, cuanto más alta es la temperatura, más rápida es la velocidad de hidrólisis y más anchos son los pesos moleculares de polisacárido que se producen con el tiempo.

Expresado de otra forma, el uso de una temperatura más baja, 55 °C frente a 95 °C al mismo pH, produce un intervalo más estrecho de pesos moleculares de polisacárido.

[0261] Además, la figura 4 muestra una correlación entre el peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 purificado con el tiempo de tratramiento para hidrólisis ácida suave (pH 4,5 a 95 °C). El polisacárido purificado es el producto final que se obtiene a partir del procedimiento de recuperación detallado anteriormente. Como también se muestra en la figura 4, un aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa de S. aureus PFESA0266 a un pH de 4,5 dio como resultado polisacárido capsular de serotipo 8 de menor peso molecular, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a un pH de 4,5 dio como resultado polisacárido capsular de serotipo 5 de mayor peso molecular. El tamaño de polisacáridos capsulares de serotipo 5 oscilaba de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a un pH de 4,5. Una correlación entre el momento de tratamiento térmico a un pH bajo y el tamaño de los polisacáridos capsulares de serotipo 5 purificados, tal como se muestra en la figura 4, permite una estimación del tiempo de tratamiento requerido para producir polisacárido purificado con un intervalo especificado de peso molecular.

[0262] Tal como se muestra anteriormente, el intervalo completo de pesos moleculares de polisacáridos capsulares de serotipo 5 de 20 kDa a más de 500 kDa puede producirse, liberarse y purificarse. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados tal como se

muestra en la tabla 14. El intervalo relativamente estrecho de peso molecular de polisacárido que se produce cuando los pesos moleculares pico varían de 63 kDa a 142 kDa representa un intervalo bien caracterizado de pesos moleculares que puede obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Un intervalo particularmente ventajoso de polisacáridos de alto peso molecular, variando de 70 kDa a 300 kDa o de 70 kDa a 150 kDa, es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando el polisacárido capsular con una proteína o molécula portadora. Las condiciones que se usan para generar el polisacárido de cápsula de CP5 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 100 a 140 kDa son tal como sigue: 95 °C, pH 4,5 durante 135 minutos. Diferentes combinaciones de pH, temperatura, y tiempo, no obstante, generarán también moléculas de CP5 con un intervalo de peso molecular de aproximadamente 100 a 140 kDa.

Tabla 14: Producción de intervalo específico de Alto peso molecular Polisacárido capsular de serotipo 5.

	Polisacárido capsular de serotipo 5,
Pase	**MW (kDa)**
1	142
2	108
3	142
4	108
5	ND
6	ND
7	63

Pase	Polisacárido capsular de serotipo 5, MW (kDa)
8	72
9	74
10	63
11	ND

ND = no realizado

Ejemplo 10: Conjugación de polisacáridos capsulares de serotipo 5 con CRM_{197}.

[0263] El presente ejemplo describe procedimientos y ensayos de caracterización que se usan en la producción de conjugados polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus-CRM_{197}. Se desarrollaron diferentes químicas de conjugación para conjugar polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus con esta proteína de portador. Por ejemplo, la conjugación usando PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida) da como resultado enlace tioéter covalente entre el CP y la proteína de portador; mientras que la conjugción usando CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 con CRM_{197} mediante química de conjugación de PDPH.

[0264] La química de conjugación de PDPH es un procedimiento de múltiples etapas que implica la activación del polisacárido, la eliminación del grupo protector de tiol, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación de la proteína CRM_{197}, y la

conjugación de los componentes activados seguido por purificación. Después de la introducción de un grupo tiol con contenido en ligador en el polisacárido y un grupo haloacetilo en el portador de proteína CRM_{197}, el polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus se unió al portador de proteína a través de un enlace tioéter. Se introdujeron grupos bromoacetilo en la proteína CRM_{197} mediante reacción de grupos amina con el éster de N-hidroxisuccimida de ácido bromoacético. Para generar polisacárido tiolado, los grupos carboxilato activados de carbodiimida de ácido N-acetilmanosaminourónico en el polisacárido se acoplaron con el grupo hidrazida del ligador heterobifuncional de hidrazida reactiva-sulfhidrilo 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH). Los tioles de PDPH-polisacárido tiolado, generados mediante reducción con DTT y purificados mediante SEC en una columna Sephadex G25, reaccionaron con los grupos bromoacetilo de proteína activada dando como resultado enlace covalente de tioéter formado mediante desplazamiento de bromo entre polisacárido y la proteína de portador. Los grupos bromoacetilo sin reaccionar se "taparon" con clorhidrato de cisteamina (clorhidrato de 2-aminoetanotiol). La mezcla de reacción se concentró a continuación y se sometió a diafiltración. Los grupos bromoacetilo no conjugados restantes se taparon con clorhidrato de cisteamina para garantizar que no quedaba ningún grupo bromoacetilo reactivo tras la conjugación. Éste formó un enlace covalente entre el extremo de tiol de cisteamina y el grupo acetilo en el residuo de lisina tras el desplazamiento de bromo.

[0265] 1. *Tiolación de Polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus con PDPH*: El polisacárido se activó en primer lugar mediante tiolación con

PDPH. Se mezcló el polisacárido con una disolución madre de PDPH recién preparada (250 mg/ml en DMSO), una disolución madre de EDAC (90 mg/ml en diH2O), y disolución madre de tampón MES (0,5 M, pH 4,85) para fabricar la disolución final 0,1 M de MES, y 2 mg y 4 mg de polisacárido capsular/ml mientras se mantiene una razón en peso de polisacárido capsular:PDPH:EDAC de 1:5:3 para polisacárido capsular de serotipo 5. Se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se dializó frente a un volumen 1000X de H2O destilada cuatro veces usando un dispositivo de diálisis 3500 MWCO a entre 4 °C y 8 °C para eliminar PDPH sin reaccionar. El polisacárido unido a PDPH se hizo DTT 0,2 M y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o durante la noche a entre 4 °C y 8 °C. Se separaron el DTT en exceso así como los productos secundarios de la reacción del sacárido activado mediante SEC usando resina Sephadex G25 y agua destilada como la fase móvil. Las fracciones se sometieron a ensayo mediante el ensayo de DTDP para grupos tiol y se agruparon las fracciones positivas que eluían cerca del volumen vacío de la columna. Se sometió a ensayo el conjunto de fracciones mediante los ensayos de PAHBAH y de O-acetilo para determinar el grado de activación, que se expresa como un porcentaje molar de las unidades de repetición con contenido en un grupo tiol (concentración molar de tioles/concentración molar de las unidades de repetición). Se liofilizó el polisacárido activado y se almacenó a -25 °C hasta que era necesario para la conjugación.

[0266] Los resultados de la reproducibilidad de la tiocilación de polisacárido de serotipo 5 con PDPH se muestran en la tabla 15. El grado de activación de polisacárido de serotipo 5 estaba en el intervalo de un 11 % a un 19 %, lo

que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de polisacárido capsular frente a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Tabla 15: Activación de polisacárido capsular de serotipo 5 con PDPH - Estudio de reproducibilidad.

Polisacárido de serotipo 5-PDPH	**Activación (% de MSH/MRU)**	**Escala, mg**	**Rendimiento, mg (%, p/p)**
1	11	23	19,6 (85)
2	13	30	28 (93)
3	19	30	23 (77)
4	15	32	29 (90)

[0267] *2. Activación de proteína de portador*: Por separado, se activó la proteína de portador mediante bromoacetilación. CRM_{197} se diluyó hasta 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM pH 7 (PBS) y a continuación se hizo NaHCO3 0,1 M pH 7,0 usando disolución madre 1 M. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS) se añadió a una razón CRM_{197}:BAANS 1:0,25 (p:p) usando una disolución madre de BAANS de DMSO 20 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a entre 4 y 8 °C durante 1 hora a continuación se purificó usando SEC sobre Sephadex G-25. El CRM_{197} activado purificado se sometió a ensayo mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y a continuación se diluyó con PBS hasta 5 mg/ml. Se añadió sacarosa a un 5 % p/vol como un crioprotector y se congeló la proteína activada y se almacenó a -25 °C hasta que era necesaria para la conjugación.

[0268] La bromoacetilación de residuos de lisina de CRM_{197} fue muy consistente, dando como resultado la activación de 19 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles (véase la tabla 16). La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Tabla 16: Rendimientos y grado de bromoacetilación de CRM_{197}.

Preparación	**Lisinas activadas (n =)**	**Escala (mg)**	**Rendimiento (% p/p)**
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

[0269] *3. Reacción de acoplamiento*: Una vez se prepararon el polisacárido de cápsula activado y la proteína de portador activada, se combinaron los dos en una reacción de conjugación. Se disolvió el polisacárido tiolado y liofilizado en borato 0,16 M pH 8,95, se mezcló CRM_{197} bromoacetilado descongelado y agua destilada para fabricar la disolución final de borato 0,1 M, razón 1:1 en p/p de CRM_{197}:polisacárido, y polisacárido capsular de serotipo 5 2 mg/ml. Se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante entre 16 y 24 horas. Se taparon los grupos bromoacetilo sin reaccionar en la proteína añadiendo clorhidrato de cisteamina en una razón de CRM_{197}:cisteamina de 1:2 (p/p) usando una disolución 135 mg/ml de cisteamina disuelta en borato 0,1 M pH 8,95 y se incubó durante 4 horas a

temperatura ambiente. El conjugado de polisacárido de cápsula-CRM_{197} (conjugado) se purificó mediante diafiltración 50 veces frente a NaCl al 0,9 % usando un ultrafiltro de polietersulfona de 100K.

[0270] Los resultados de la reproducibilidad de los estudios de tiolación de polisacárido capsular de serotipo 5 con PDPH mostraron que el grado de activación estaba en el intervalo de un 11 % a un 19 %, lo que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de CP con respecto a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición.

Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 con CRM_{197} mediante química de conjugación de CDT.

[0271] CDT proporciona un procedimiento de conjugación de una sola etapa en el que el polisacárido se activa en un entorno anhidro (DMSO) para formar restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición de un portador de proteína (en DMSO) conduce al desplazamiento nucleofílico del triazol mediante lisinas y formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados). Se diluye la disolución de reacción 10 veces en una disolución acuosa en preparación para purificación mediante filtración de flujo tangencial.

[0272] La química de conjugación de CDT produjo un polisacárido capsular de serotipo 5 con enlace covalente con la proteína de portador, que se indicaba por la presencia del sacárido y la proteína en las fracciones en cromatografía de exlusión molecular, y mediante análisis de aminoácidos de conjugado de clorhidrato de cisteamina tapado o glicolaldehído tapado.

[0273] Un resumen de los resultados de la preparación de varios lotes de conjugados preparados mediante químicas tanto de PDPH como de CDT para tamaños de polisacárido capsular de serotipo 5 en el intervalo de 20 kDa a 40 kDa se muestra en la tabla 17 a continuación. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estas químicas de conjugación. La antigenicidad de polisacárido conjugado capsular de serotipo 5 no se vio alterada por la conjugación tal como se representa mediante la linea de precipitinas de identidad entre conjugados y polisacárido nativo.

Tabla 17: Caracterización del polisacárido capsular de serotipo 5-CRM_{197} preparado mediante dos químicas de conjugación.

Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Razón de rendimiento	Azúcar libre (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificad
CDT	19-27	35	0,5-0,8	10-40	< 1	18-22
PDPH	26-52	40-99	0,4-1,0	23-50	ND	ND

ND = no detectado

[0274] Tal como se muestra anteriormente, los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. Se buscaba preparar conjugados a partir de un intervalo

preseleccionado de alto peso molecular que pudiera ser filtrado y polisacárido capsular de serotipo 5 purificado para su uso en composiciones inmunogénicas. La tabla 18 resume el análisis de conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 en los que el peso molecular de polisacárido de cápsula de serotipo 5 oscilaba de aproximadamente 92 kDa a aproximadamente 119 kDa y activado con triazol (CDT). Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 1.533 kDa a 2.656. El número de lisinas conjugadas por CRM_{197} oscilaba de un alto número de 22 a un bajo número de 15. El polisacárido de cápsula libre oscilaba de un alto número de un 18 % a un bajo número de un 11 %.

Tabla 18: Conjugados con intervalo de peso molecular preseleccionado de polisacárido capsular de serotipo 5.

Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento (%)	Sac. libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas modificadas
1	121	63	11	2.130	19
2	92	72	16	1.533	22
3	119	74	14	2.656	15
4	115	63	18	1.911	15

[0275] Ambas químicas de conjugación producen un polisacárido capsular de serotipo 5 con enlace covalente con proteína de portador. No hubo diferencias significativas en polisacárido de cápsula libre, razón de polisacárido capsular de serotipo 5-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

232

Ejemplo 11: Complejo frente a procedimientos de CDT en un solo recipiente.

[0276] Tal como se describe anteriormente, los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica CDT (1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) o PDPH (3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida). El uso de CDT dio como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre el polisacárido capsular y la proteína de portador, mientras que el uso de PDPH da como resultado un ligador de cinco carbonos con contenido en enlace tioéter covalente entre el polisacárido capsular y la proteína de portador.

[0277] El procedimiento basado en PDPH era un procedimiento de múltiples etapas que implicaba la activación del polisacárido, la eliminación de un grupo protector de tiol en el polisacárido, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación del portador de proteína, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. En el presente procedimiento, polisacáridos capsulares de serotipo 5 de S. aureus se hicieron reaccionar con PDPH y una carbodiimida en un disolvente orgánico tal como DMSO para producir polisacáridos unidos a PDPH. Los polisacáridos unidos a PDPH se hicieron reaccionar con un agente reductor para producir polisacáridos activados que se purificaron a continuación. Proteínas de portador se hicieron reaccionar con ácido bromoacético en un disolvente orgánico para producir proteínas portadoras activadas que se purificaron a continuación. Los polisacáridos de

serotipo 5 activados purificados se hicieron reaccionar a continuación con las proteínas portadoras activadas purificadas para producir conjugados de polisacárido de serotipo 5-proteína portadora.

[0278] Por el contrario, los procedimientos basados en CDT eran procedimientos de conjugación de una sola etapa, en la el polisacárido capsular se activaba en un entorno anhidro (es decir, DMSO) para formar restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición del portador de proteína (en DMSO) condujo a un desplazamiento nucleofílico del imidazol o triazol mediante lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos activados), permitiendo de ese modo que proceda la conjugación en "un solo recipiente". Por consiguiente, se desarrollaron dos procedimientos basados en CDT: un procedimiento más complejo y un procedimiento en un solo recipiente más sencillo. En el procedimiento más complejo, se combinaron polisacáridos capsulares de serotipo 5 de S. aureus con imidazol o triazol y a continuación se hicieron reaccionar con CDT en un disolvente orgánico (tal como DMSO) y aproximadamente un 0,2 % p/v de agua para producir polisacáridos de serotipo 5 activados. Los polisacáridos de serotipo 5 activados se purificaron y a continuación se hicieron reaccionar con proteínas portadoras en el disolvente orgánico para producir conjugados de polisacárido de serotipo 5-proteína portadora. El procedimiento en un solo recipiente era similar al procedimiento complejo excepto en que los polisacáridos de serotipo 5 activados no se purificaban antes de la reacción con proteínas portadoras.

Procedimiento de CDT complejo

[0279] *Activación de polisacárido capsular de serotipo 5*: Se mezcló polisacárido capsular de serotipo 5 con 10 g de triazol/g de polisacárido capsular de serotipo 5 y se liofilizó. Se disolvió la torta resultante en DMSO a 2,0 mg de polisacárido capsular de serotipo 5/ml. Se determinó el contenido en agua y se ajustó a 0,2 %. Una disolución recién preparada de CDT a 100 mg/ml en DMSO se añadió para conseguir una cantidad de CDT en un exceso molar de 20 veces en comparación con la cantidad de CP5. Alternativamente, la cantidad de CDT que se añade puede ajustarse para obtener un grado de activación más alto o más bajo. Esto se mantuvo 30 minutos a 23 °C.

[0280] *Purificación de polisacárido de serotipo 5 activado capsular*: La disolución de polisacárido de serotipo 5 activado capsular (ACP5) se vertió en 25 volúmenes de agua para destruir el CDT en exceso. Ésta se concentró hasta su volumen original sobre una membrana de PES de 10 kDa a aproximadamente 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a agua para al menos 10 volúmenes. Esta etapa se completó en menos de 4 horas. Se mezcló el material diafiltrado con 10 g de triazol/g de polisacárido de serotipo 5 original y se liofilizó.

[0281] *Preparación de CRM liofilizado*: CRM se sometió a diafiltración frente a NaCl al 0,4 %/sacarosa al 5 % a volumen constante sobre una membrana de PES de 10 kDa para al menos 10 volúmenes. La concentración de proteína se determinó y se añadió suficiente tampón de diafiltración para llevar la concentración de proteína hasta 5,0 g/l, proporcionando de este modo una razón en p/p de NaCl/CRM = 0,8. Se liofilizó el CRM.

[0282] *Conjugación*: Se disolvió polisacárido capsular de serotipo 5 activado, diafiltrado, en DMSO a 1 mg/ml. Se añadió disolución de borato a 100 mM para conseguir un 2 % v/v.

[0283] CRM volvió a suspenderse a 2 mg/ml y, cuando se completó la disolución, se combinó con la disolución de ACP5. Ésta se dejó reaccionar a 4 °C durante 20 horas.

[0284] Se vertió la reacción de conjugado en 24 volúmenes de borato 5 mM pH 9,0 y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se ajustó a pH 7,5 con tampón fosfato 0,5 M, pH 6,5. Ésta se filtró a través de un filtro de 5 micrómetros y se concentró hasta el volumen original sobre una membrana de PES de 300 kDa a una carga de ~ 1 mg/cm2 y se diafiltró frente a al menos 10 volúmenes de agua. El concentrado resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

Procedimiento de en un solo recipiente de CDT

[0285] *Intercambio de matriz de CRM_{197}*: CRM_{197} se sometió a diafiltración para intercambiar de la matriz voluminosa de fosfato aproximadamente 10 mM/NaCl 80 mM/sacarosa al 15 %, pH de 7 a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %,/octil-β-D-glucopiranósido 15 mM; pH 7. El intercambio permitió la eliminación de fosfato y sacarosa que son perjudiciales para la conjugación y define el contenido en cloruro de sodio portado en la conjugación. Se añade octil-β-D-glucopiranósido para prevenir la formación de partículas tras la filtración estéril.

La matriz de la CRM_{197} se intercambió mediante filtración de flujo tangencial frente a imidazol 5 mM/NaCl al 0,72 %/octil-β-D-glucopiranósido 15 mM, pH

7 a través de 10 diavolúmenes usando membranas de PES de MWCO de 10K a una concentración de retentato de aproximadamente 4 mg/ml. La exposición de membrana típica era de 2 gramos/ft2 y la concentración de CRM_{197} final diana en la matriz era de 6 mg/ml. La CRM_{197} se almacenó a 2 ºC-8 ºC.

[0286] *Activación/Conjugación*: El procedimiento de activación/conjugación para polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus consistió en las siguientes etapas: 1) Combinación del polisacárido; 2) Congelación superficial y liofilización de CRM_{197} y polisacárido combinado; 3) Disolución del polisacárido liofilizado y CRM_{197}; 4) Activación del polisacárido; 5) Conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}; y 6) Purificación del conjugado (dilución, diafiltración, filtración estéril).

[0287] El polisacárido se combinó con 10 gramos de excipiente de 1,2,4-triazol por gramo de polisacárido. El excipiente se añadió como un polvo al polisacárido, con una disolución que se obtiene tras menos de 15 minutos de mezclado a temperatura ambiente.

[0288] El polisacárido combinado y CRM_{197} se congelaron superficialmente por separado usando un baño de etanol a -75 ºC. El volumen por frasco de 1 l era de aproximadamente 500 ml.

[0289] Para la disolución de polisacárido, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales del polisacárido para obtener una suspensión y a continuación se transfirió al recipiente de reacción de activación/conjugación para calentar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Se obtuvo una disolución transparente tras 5 a 10 minutos de mezclado.

[0290] Para la disolución de CRM_{197}, se añadió DMSO a los frascos de liofilización individuales con contenido en CRM_{197} para obtener una suspensión y a continuación se transfirió a un segundo recipiente para mezclar. Se añadió DMSO hasta obtener una concentración de 2 g/l. Habitualmente se obtuvo una disolución transparente en menos de 15 minutos.

[0291] La disolución de polisacárido/DMSO se muestreó por el análisis de Karl Fischer para determinar el contenido en humedad. CDT se preparó como una disolución 100 mg/ml en DMSO y se añadió a un exceso molar de 5 con respecto a polisacárido de tipo 5 (el procedimiento complejo usaba 20 equivalentes molares de CDT mientras que el procedimiento en un solo recipiente usaba 5 equivalentes molares de CDT:CP5). La adicón continua de la disolución de CDT se realizó a lo largo de aproximadamente 5 minutos a 23 °C + 2 °C con mezclado. Se dejó avanzar la reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C ± 2 °C. La reacción se muestreó para determinar el nivel de activación (UV 220/205 nm) y a continuación se añadió borato de sodio 100 mM, pH 9 hasta obtener una disolución acuosa al 1,5 %. A continuación se agitó la disolución de reacción durante un mínimo de 30 minutos a 23 °C + 2 °C.

[0292] Para la conjugación del polisacárido activado con CRM_{197}, DMSO se añadió para obtener una concentración de reacción de 0,55 mg/ml. El CRM_{197} disuelto en DMSO se añadió a continuación a la disolución de polisacárido activado con mezclado. Se agitó la reacción durante un mínimo de 16 horas a 23 °C + 2 °C.

[0293] La reacción disolución se diluyó 10X con tetraborato de sodio 5 mM, pH 8,6 para obtener un pH diluido final de 9 ± 0,2. La disolución se agitó a 23 ± 3 °C durante un mínimo de 4 horas. La disolución diluida se pasó a través de un filtro de 5 µm y se concentró hasta una concentración de retentato diana de 2 g/l. La filtración de flujo tangencial se realizó usando membranas de celulosa regeneradas de 300K a través de 20 diavolúmenes con succinato 5 mM, pH 7. La exposición de membrana típica era de 1 gramo/ft2. El conjugado purificado se pasó a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 2 °C-8 °C.

Ejemplo 12: Conjugación de polisacárido capsular de serotipo 5 usando el procedimiento de conjugación en un solo recipiente y complejo.

[0294] El presente ejemplo muestra que el intervalo preseleccionado de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede usarse para conjugación o bien en el procedimiento en un solo recipiente o bien en el procedimiento complejo. Los polisacáridos más grandes se producen inicialmente por las células bacterianas y el intervalo de peso molecular purificado resultante puede controlarse mediante el pH y el calor del procedimiento de hidrólisis en el ejemplo 9. En el presente ejemplo, se seleccionaron ocho lotes en los que el peso molecular de polisacárido capsular de serotipo 5 oscilaba de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 140 kDa y se realizó la conjugación usando activación con triazol (CDT) en los procedimiento o bien en un solo recipiente o bien complejo que se describen anteriormente. Véase la tabla 19. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 1.125 kDa a 2.656 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM oscilaba de un número alto

de 22 a un bajo número de 15. El azúcar libre oscilaba de un alto número de un 23 % a un bajo número de un 11 %.

Tabla 19: Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados con polisacáridos capsulares de 90 kDa a 140 kDa.

Procedimiento	Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento de sac. (%)	Azúcar libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas
En un solo recipiente	1	142	93	11	1.932	19
	2	108	93	14	1.117	20
	3	142	85	17	1.609	15
	4	108	86	23	1.125	15
Complejo	1	121	63	11	2.130	19
	2	92	72	16	1.533	22
	3	119	74	14	2.656	15
	4	115	63	18	1.911	15

Ejemplo 13: Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 muestran constantemente protección en modelo de pielonefritis murino.

[0295] Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 se evaluaron para determinar su capacidad para proteger a ratones en un modelo de pielonefritis. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición a S. aureus i.p. se redujeron significativamente en comparación con controles inmunizados con PBS.

[0296] Los seis estudios individuales mostraron una reducción significativa en ufc/ml de riñones en los animales inmunizados (la figura 9). Cuando estos estudios se agruparon para metanálisis, la significación global para los estudios como un todo aumentó hasta por debajo de 0,0001. Los datos mostraron una reducción constante de la colonización de riñones trs vacunaciones activas con el polisacárido capsular conjugado.

Ejemplo 14: Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados mediante diferentes químicas de conjugación protejen a los ratones frente a infecciones experimentales.

[0297] Los estudios de inmunización activa en el modelo de pielonefritis murino se llevaron a cabo con conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 preparados mediante química o bien de PDPH o bien de CDT. Los procedimientos para conjugar polisacáridos capsulares con CRM_{197} se describen anteriormente. Los resultados mostraron que ambos conjugados reducen la colonización en ratones en comparación con animales inmunizados sham (tabla 20).

Tabla 20: Efecto de la conjugación de PDPH frente a CDT sobre la protección frente a exposición a S. aureus en el modelo de pielonefritis.

Estudio Nº	Antígenos	Cepa/Dosis	logUFC/Riñón	Significa
Estudio 1	Solución salina + AlPO4	PFESA0266	5,53 ± 1,90	--
	1 mcg de CP5-CRM (PDPH) + AlPO4	2 x 108	3,01 ± 1,83	p < 0,001
	1 mcg de CP5-CRM (CDT) + AlPO4		1,67 ± 0,23	p < 0,000
Estudio 2	Solución salina + AlPO4	PFESA0266s	6,17 ± 1,76	--
	1 mcg de CP5-CRM (PDPH) + AlPO4	2,7 x 108	3,06 ± 1,69	p < 0,000
	1 mcg de CP5-CRM (CDT) + AlPO4		1,87 ± 0,69	p < 0,000

Ejemplo 15: La inmunización activa de conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 protege a fatas en un modelo de endocarditis de rata.

[0298] Cuatro estudios se llevaron a cabo con conjugado de de PDPH CP5-CRM_{197}. Los conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 reducián significativamente las UFC recuperadas después de una exposición a PFESA0266 de S. aureus tanto en el corazón como los riñones en 2 de 3 experimentos (tabla 21). En el tercer estudio, el título anti-CP5 medio geométrico (TMG) fue el más bajo de los tres experimentos, pero sólo fue ligeramente más bajo que en el experimento previo.

Tabla 21: La inmunización con polisacárido capsular de serotipo 5-CRM_{197} reduce las UFC en un modelo de endocarditis de rata.

		Log UFC Recuperadas		Significación		TMG
Composición inmunogénica	**Cepa de exposición/Dosis**	**Corazón**	**Riñón**	**Corazón**	**Riñón**	**Título de CP**
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,34± 1,78	3,92 ± 1,73			103.000
1 mcg de PP5-CRM	2,21 x 10^8 ufc	7,94± 0,78	6,77 ± 0,79	p < 0,001	p < 0,05	
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,43± 2,30	3,11 ±			51.000

		Log UFC Recuperadas	Significación		TMG
Solución salina	6,5 x 10^7 ufc	5,63± 2,48	2,33 4,19 ± 2,05	No	No	
1 mcg de CP5-CRM	PFESA0266	4,01± 2,49	3,90 ± 1,92			67.000
Solución salina	4,0 x 10^8 ufc	7,52± 1,38	6,52 ± 1,17	p < 0,0002	p < 0,0002	

Ejemplo 16: Inmunogenicidad potenciada de vacunas de conjugado de CP5 HMW en ratones en comparación con vacunas de conjugado de CP5 LMW

[0299] Se realizó un estudio de pielonefritis murina para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de diferentes formulaciones de conjugado de CP5. Se sometieron a prueba dos formulaciones: La primera formulación estaba compuesta por un CP5 de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 300 kDa) conjugado con CRM_{197}. La segunda formulación contenía un CP5 de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM_{197}. Se sometieron a prueba tres niveles de dosis para la vacuna de HMW (1, 0,1 y 0,01 mcg). La vacuna de LMW se sometió a prueba a 1 mcg. También estaba incluido un grupo de

control negativo compuesto por una vacuna de conjugado de polisacárido derivada de Streptococcus pneumoniae conjugado con CRM_{197} (PP5). Los polisacáridos se formularon con 22 mcg de AlPO4 en las semanas 0, 3 y 6 y se expusieron a PFESA0266 de S. aureus en la semana 8. Se extrajeron los riñones se y se contaron las colonias bacterianas 48 horas después de una exposición. Ambas vacunas fueron eficaces para generar una respuesta inmunitaria y se observó una reducción en las UFC de PFESA0266 de S. aureus en los riñones de ratones vacunados con los grupos de 1 µg grupos de vacuna tanto de HMW como de LMW. Esto dependiá de la dosificación tal como se muestra mediante la eficacia reducida con respecto a las dosificaciones de vacuna más bajas (figura 10). La lectura de UFC no era suficientemente sensible para detectar una diferencia en cuanto a la eficacia para las vacunas de HMW y de LMW. Los sueros de los ratones se sometieron a prueba por lo tanto mediante OPA. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 40 % de la cepa S. aureus PFESA0266 en un ensayo de OPA. Se observaron títulos aumentados de OPA para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (figura 11).

Ejemplo 17: Los conjugados de polisacárido de cápsula que comprenden polisacáridos de alto peso molecular muestran una inmunogenicidad aumentada en comparación con los conjugados que comprenden polisacáridos de bajo peso molecular.

[0300] Se llevaron a cabo estudios en primates no humanos (NHP) para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones de conjugado de cápsula. Se sometieron a prueba dos formulaciones a dos niveles de

dosificación diferentes (2 y 20 µg). La primera formulación contenía un polisacárido de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 130 kDa) conjugado con CRM_{197}. La segunda formulación contenía un polisacárido de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM_{197}. Se vacunaron grupos de cinco primates con una dosis individual de una u otra de vacuna y se monitorizaron los títulos inmunitarios antes de la vacunación y dos semanas después de la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 40 % de cepa S. aureus PFESA0266 en un esnayo de OPA. También se monitorizaron los títulos de anticuerpo mediante ELISA. Se observó una actividad aumentada para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (tabla 22), que se demuestra por un aumento de diez veces en los títulos de anticuerpo para la vacuna de HMW en comparación con la vacuna de LMW. La tasa de sujetos que responden a OPA para los NHP que recibieron la vacuna de HMW fue también más alta (un 80 % en comparación con un 40 %).

Tabla 22. Se observa inmunogenicidad aumentada para vacunas de conjugado de polisacárido de HMW en comparación con vacuna de conjugado de polisacárido de LMW.

	Nivel de dosis de CP5-CRM_{197} (mcg) por animal	**Media geométrica de PD1***	**Tasa de sujetos que responden a OPA (%)±**
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25	20	3	40

kDa)	2	8	40

* Aumento en veces calculado a partir del título de ELISA de CP5 2 semanas tras la vacunación en comparación con los títulos antes de la vacuna. ± Tasa de sujetos que responden calculada a partir de monos que generan un aumento en el título de OPA tras una dosis individual de vacuna 2 semanas tras la vacunación. Cada grupo contenía 5 macacos Rhesus y las vacunas se formularon con AlPO4 (250 mcg/dosis)

Ejemplo 18: La O-acetilación de polisacárido es importante para la inducción de respuestas de anticuerpos protectores frente a conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5.

[0301] Para evaluar la importancia de la O-acetilación de polisacárido capsular de serotipo 5, se O-desacetiló el polisacárido capsular nativo (dOAc) y conjugado con CRM_{197} (dOAc-CRM_{197}) usando química de conjugación de PDPH, tal como se analiza anteriormente. La eficacia de conjugado de dOAcCP-CRM_{197} se comparó junto con CP5-CRM_{197} en un modelo de pielonefritis murino.

[0302] La inmunización con conjugados carentes de grupos O-acetilo (dOAc CP5-CRM) no reducía las ufc bacterianas recuperadas en los riñones. Estos datos (tabla 23) indican que la O-acetilación es importante para obtener anticuerpos funcionales frente a CP5.

Tabla 23: La inmunización con Conjugados de polisacárido capsular de serotipo 5 des-O-acetilados no protegía a los ratones frente a la conolización de riñón.

Estudio Nº	Antígenos	Cepa/Dosis	LogUFC/Riñón	Significación

		PFESA026		
Estudio 1	1 mcg de PP5-CRM	6	3,89 ± 2,24	
	1 mcg de dOAc CP5-CRM	7×10^8	4,20 ± 1,75	
	1 mcg de CP5-CRM		1,75 ± 0,39	valor p < 0,008
		PFESA026		
Estudio 2	Solución salina	6	5,08 ± 1,96	
	1 mcg de dOAc CP5-CRM	$2,4 \times 10^8$	5,89 ± 1,29	
	1 mcg de de CP5-CRM		2,93 ± 2,11	valor p < 0,02

Ejemplo 19: Confirmación de la importancia de la O-acetilación como epítopo funcional de polisacárido capsular de serotipo 5 mediante OPA usando anticuerpos monoclonales con especificidades conocidas.

[0303] Se evaluaron anticuerpos monoclonales frente a polisacárido capsular de serotipo 5 con especificidades para OAc + (CP5-7-1), OAc + /- (CP5-5-1) y OAc- (CP5-6-1) para determinar la actividad de destrucción de OP frente a la cepa PFESA0266 de tipo 5 (tabla 24). Se usaron anticuerpos monoclonales frente a polisacárido capsular de serotipo 8 (CP8-3-1 específico frenet a CP8 OAc +) como control negativo.

[0304] El AcM anti-CP5 específico de OAc CP5-7-1 mediaba la destrucción de PFESA0266 de S. aureus (tabla 24). También el anticuerpo monoclonal CP5-5-1, que reconoce epítopos compartidos tanto por CP5 OAc + como por CP5 OAc-, mediaba la destrucción de la cepa PFESA0266. El anticuerpo

monoclonal específico para epítopos presentes en polisacárido capsular OAc- de serotipo 5 no mediaba la destrucción de la cepa PFESA0266. Estos resultados indican que son necearios epítopos de O-acetilo en el polisacárido capsular de serotipo 5 para provocar una actividad funcional de anticuerpos específicos de serotipo 5.

[0305] Los anticuerpos necesitan ser funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que supervisa la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

Tabla 24: Los anticuerpos monoclonales específicos frente a polisacárido capsular de serotipo 5 O-acetilado (+) y Polisacárido capsular de serotipo 5 O- y des-O-acetilado (+ /-) son opsónicos frente a PFESA0266 de S. aureus (tipo 5).

CP5-5-1 (O-Ac + /-) (mcg) 20 10 5 2,5				**CP5-6-1 (O-Ac -) (mcg) 20 10 5 2,5**				**CP5-7-1 (O-Ac +) (mcg) 20 10 5 2,5**				**CP8-3-1 (-control) (mcg) 20 10 5 2,5**			
28	33	30	21	-12	-5	-12	-5	31	46	49	55	-18	-3	-13	-5

Datos notificados como porcentaje de destrucción y calculados determinando la razón del número de UFC que sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de UFC que sobrevivieron en pocillos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células HL-60.

Ejemplo 20: Se observa inmunogenicidad aumentada para conjugados de CP5 compuestos por polisacáridos de alto peso molecular en comparación con polisacáridos de bajo peso molecular en primates no humanos (NHP).

[0306] Se llevaron a cabo estudios en primates no humanos (NHP) para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones de conjugado de cápsula. Se sometieron a prueba dos formulaciones a dos niveles de dosificación diferentes (2 y 20 µg). La primera formulación estaba compuesta por un polisacárido de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 130 kDa) conjugado con CRM_{197}. La segunda formulación contenía un polisacárido de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM_{197}. Se vacunaron grupos de cinco primates con una dosis individual de una u otra vacuna y se monitorizaron los títulos inmunitarios antes de la vacunación y dos semanas tras la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 40 % de cepa S. aureus PFESA0266 en un ensayo de OPA. También se monitorizaron los títulos de anticuerpo mediante ELISA. Se observó una actividad aumentada para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (tabla 25). Hubo un aumento de tres a diez veces en los títulos de anticuerpo para la vacuna de HMW en comparación con la vacuna de LMW. La tasa de sujetos que responden a OPA para los NHP que recibieron la vacuna de HMW fue también más alta (un 80 % en comparación con un 40 %).

Tabla 25: Enhanced Inmunogenicidad se observa para HMW polisacárido conjugado vacunas en comparación con LMW polisacárido conjugado vacuna.

	Nivel de dosis de CP5-CRM_{197} (mcg) por animal	**Media geométrica de PD1***	**Tasa de sujetos que responden a OPA (%)±**
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

* Aumento en veces calculado a partir de título de ELISA de CP5 2 semanas tras la vacunación en comparación con títulos antes de la vacuna. ± Tasa de sujetos que responden calculada a partir de monos que generan un aumento en el título de OPA tras una dosis individual de vacuna 2 semanas tras la vacunación. Cada grupo contenía 5 macacos Rhesus y las vacunas se formularon con AlPO4 (250 mcg/dosis)

RESUMEN

[0307] Las dos químicas de conjugación, que se describen en el presente documento, producían un polisacárido capsular de serotipo 5 con enlace covalente con la proteína de portador CRM_{197}. No hubo diferencias significativas en sacárido libre, razón de polisacárido de serotipo 5-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

241

[0308] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora por referencia.

[0309] A pesar de que la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y de ejemplo para los fines de claridad de comprensión, pueden ponerse en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, en el que:

a) el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa.

2. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 1, en el que el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa.

3. Un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, en el que:

a) el polisacárido tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa.

4. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 3, en el que el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 5.000 kDa.

5. El conjugado inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polisacárido tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa.

6. El conjugado inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el conjugado tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

7. El conjugado inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 10 y un 100 %

8. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 7, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 50 y un 100 %.

9. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 7, en el que el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 75 y un 100 %.

10. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el conjugado inmunogénico puede producir anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

11. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la proteína de portador es la CRM_{197}.

12. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 11, en el que la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos.

13. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 11 o 12, en el que la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1.

14. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 13, en el que al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar al menos en cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

15. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 13 o 14, en el que al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar en cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

16. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

17. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 16, en el que la CRM_{197} comprende de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

18. El conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende menos de un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

19. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 18, que comprende menos de un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

20. Una composición inmunogénica que comprende el conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

21. La composición inmunogénica de la reivindicación 20, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.

22. La composición inmunogénica de la reivindicación 21, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

23. La composición inmunogénica de la reivindicación 21, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.

24. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, que comprende menos de un 30 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

25. La composición inmunogénica de la reivindicación 24, que comprende menos de un 20 % de polisacárido libre de tipo 5 u 8 en comparación con la cantidad total de polisacárido de tipo 5 o 8.

26. Un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria a un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 o de serotipo 8 de Staphylococcus aureus en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25.

27. Un procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus aislado con carbonil-ditriazol (CDT) en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de serotipo 8 activado; y

b) hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 8 activado con una proteína de portador en un disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador;

en el que se produce un conjugado inmunogénico que comprende un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus-proteína de portador.

28. Un procedimiento de producción de un conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus aislado con carbonil-ditriazol (CDT) en un disolvente orgánico para producir un polisacárido de serotipo 8 activado; y

b) hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 activado con una proteína de portador en un disolvente orgánico para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5-proteína de portador;

en el que se produce un conjugado inmunogénico que comprende un conjugado de polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus-proteína de portador.

29. El procedimiento de la reivindicación 27 o la reivindicación 28, que además comprende:

liofilizar el polisacárido aislado; y volver a suspender el polisacárido liofilizado en un disolvente orgánico.

30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que el polisacárido aislado activado se aísla con respecto a la reacción de activación antes de hacer que reaccione con la proteína de portador.

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que la etapa b) comprende:

i) liofilizar el polisacárido aislado activado aislado para producir un polisacárido aislado activado liofilizado;

ii) liofilizar la proteína de portador para producir una proteína de portador liofilizada; y

iii) volver a suspender el polisacárido aislado activado liofilizado y la proteína de portador liofilizada en un disolvente orgánico para producir un polisacárido aislado activado mezclado con una proteína de portador.

32. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, que además comprende la dilución de la mezcla de reacción de la etapa b) en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 9,2 durante al menos 4 horas a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C.

33. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, que además comprende la dilución de la mezcla de reacción de la etapa b) en un tampón y mantener un pH de aproximadamente 9,0 durante al menos 4 horas a aproximadamente 23 °C.

34. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, que además comprende aislar el conjugado de polisacárido capsular de serotipo de S. aureus-proteína de portador.

35. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34, en el que el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar.

36. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA).

37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO).

38. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 y 29 a 37, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido con CDT comprende determinar el agua presente en el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus y ajustar la concentración de CDT a una razón molar de aproximadamente 1:1 de CDT:agua en el disolvente orgánico.

39. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 y 29 a 38, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido con CDT comprende determinar el agua presente en el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus y ajustar la concentración de CDT a una razón molar de aproximadamente 0,5:1 de CDT:agua en el disolvente orgánico.

40. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 y 29 a 38, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido con CDT comprende determinar el agua presente en el polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus y ajustar la concentración de CDT a una razón molar de aproximadamente 0,75:1 de CDT:agua en el disolvente orgánico.

41. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido de serotipo 5 con CDT comprende proporcionar aproximadamente un exceso molar de 20 veces de CDT en comparación con el polisacárido.

42. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37 y 41, en el que el polisacárido de serotipo 5 CDT en una mezcla de disolvente orgánico se ajusta a una concentración acuosa de entre un 0,1 y un 0,3 %.

43. El procedimiento de la reivindicación 42, en el que la concentración acuosa se ajusta a un 0,2 %.

44. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 43, en el que la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo activado comprende una diafiltración.

45. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 44, en el que antes de la liofilización la proteína de portador se somete a diafiltración frente a NaCl y la razón en p/p de NaCl/proteína de portador de proteína se ajusta a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5.

46. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45, en el que la proteína de portador es la CRM_{197}.

47. El procedimiento de la reivindicación 46, en el que se hace que reaccione el polisacárido de serotipo activado con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

48. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 47, en el que el polisacárido capsular de serotipo de S. aureus aislado se mezcla con imidazol o triazol antes del mezclado con CDT en un disolvente orgánico.

49. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 48, que además comprende hidrolizar el conjugado de polisacárido de serotipo-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar.

50. Un procedimiento de fabricación de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus con 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH) y una carbodiimida en un disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH;

b) hacer que reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado;

c) aislar el polisacárido de serotipo 8 activado para producir un polisacárido de serotipo 8 activado aislado;

d) proporcionar una proteína de portador activada;

e) hacer que reaccione el polisacárido aislado de serotipo 8 activado con la proteína de portador activada para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 8-proteína de portador; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

51. Un procedimiento de fabricación de un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de Staphylococcus aureus aislado conjugado con una proteína de portador, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) hacer que reaccione un polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus con 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH) y una carbodiimida en un disolvente orgánico para producir un polisacárido unido a PDPH;

b) hacer que reaccione el polisacárido unido a PDPH con un agente reductor para producir un polisacárido activado;

c) aislar el polisacárido de serotipo 5 activado para producir un polisacárido de serotipo 5 activado aislado;

d) proporcionar una proteína de portador activada;

e) hacer que reaccione el polisacárido aislado de serotipo 5 activado con la proteína de portador activada para producir un conjugado de polisacárido de serotipo 5-proteína de portador; mediante lo cual se produce un conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

52. El procedimiento de la reivindicación 50 o la reivindicación 51, en el que la proteína de portador activada se aísla antes de hacer que reaccione la proteína de portador activada con el polisacárido activado.

53. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 52, en el que:
la etapa c) además comprende liofilizar el polisacárido aislado de serotipo 8 activado para producir un polisacárido de serotipo activado liofilizado.

54. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, en el que el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar.

55. El procedimiento de la reivindicación 54, en el que el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, y hexametilfosforamida (HMPA).

56. El procedimiento de la reivindicación 55, en el que el disolvente aprótico polar es dimetilsulfóxido (DMSO).

57. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 56, en el que la carbodiimida es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC).

58. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 57, en el que la etapa de hacer que reaccione el polisacárido capsular de serotipo con

PDPH y EDAC en un disolvente orgánico comprende mantener una razón en peso de polisacárido:PDPH:EDAC de aproximadamente 1:5:3.

59. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 58, en el que el agente reductor es ditiotreitol (DTT).

60. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 59, en el que la activación de la proteína de portador comprende hacer que reaccione la proteína de portador con un ácido bromoacético.

61. El procedimiento de la reivindicación 60, en el que el ácido bromoacético comprende el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS).

62. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 61, en el que la etapa de aislamiento del polisacárido de serotipo activado comprende una diafiltración.

63. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 62, en el que la etapa de aislamiento de la proteína de portador activada comprende una diafiltración.

64. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 63, que además incluye la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de

serotipo-proteína de portador para eliminar grupos de activación sin reaccionar.

65. El procedimiento de la reivindicación 64, en el que la etapa de hidrolización del conjugado de polisacárido de serotipo-proteína de portador comprende la adición de clorhidrato de cisteamina.

66. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 65 que además comprende aislar el conjugado inmunogénico que comprende un polisacárido capsular de serotipo de S. aureus aislado conjugado con una proteína de portador.

67. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que el aislamiento del polisacárido de serotipo-proteína de portador conjugado comprende una diafiltración.

68. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 67, en el que dicha proteína de portador es la CRM_{197}.

69. El procedimiento de la reivindicación 68, en el que se hace que reaccione el polisacárido de serotipo activado con la CRM_{197} en una razón en peso de aproximadamente 1:1.

70. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 69, en el que el polisacárido activado tiene un tamaño de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 1.000 kDa.

71. El procedimiento de la reivindicación 70, en el que el polisacárido activado tiene un tamaño de entre aproximadamente 50 kDa y 500 kDa.

72. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 71, en el que el conjugado de polisacárido-proteína inmunogénico tiene un tamaño de entre 400 kDa y aproximadamente 5.000 kDa.

73. Un conjugado inmunogénico que se produce mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 72.

74. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 73, que comprende más de aproximadamente un 1 % de polisacárido libre y menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre.

75. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 73, que comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido libre.

76. Una composición inmunogénica que comprende el conjugado inmunogénico de cualquiera de las reivindicaciones 73 a 75 y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

77. La composición inmunogénica de la reivindicación 76, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.

78. La composición inmunogénica de la reivindicación 77, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

79. La composición inmunogénica de la reivindicación 78, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.

80. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, que comprende menos de un 30 % de tipo polisacárido libre en comparación con la cantidad total de tipo polisacárido.

81. La composición inmunogénica de la reivindicación 80, que comprende menos de un 20 % de tipo polisacárido libre en comparación con la cantidad total de tipo polisacárido.

82. Un polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus que tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa unido covalentemente a una proteína de portador; en el que el peso molecular combinado del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador es de entre aproximadamente 200 kDa y 5.000 kDa.

83. Un polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus que tiene un peso molecular de entre 20 kDa y 1.000 kDa unido covalentemente a una proteína de portador; en el que el peso molecular combinado del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador es de entre aproximadamente 200 kDa y 5.000 kDa.

84. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 82 o la reivindicación 83, en el que el polisacárido tiene un intervalo de peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa.

85. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 82 o la reivindicación 83, que tiene un intervalo de peso molecular de entre 500 kDa y 2.500 kDa.

86. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 82 o la reivindicación 83, en el que la proteína de portador es la CRM_{197}.

87. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 86, en el que la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos.

88. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 86 o la reivindicación 87, en el que la razón molar de lisinas

conjugadas con respecto a CRM_{197} es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1.

89. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de una cualquiera de la reivindicación 88, en el que al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar al menos en cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

90. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 88 o la reivindicación 89, en el que al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar en cada 5 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

91. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de cualquiera de las reivindicaciones 88 a 89, en el que la CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

92. El polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de la reivindicación 91, en el que la CRM_{197} comprende de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido.

93. Una composición inmunogénica que comprende el polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de cualquiera de las reivindicaciones 82 a 92 y al menos uno de un adyuvante, diluyente, o portador.

94. La composición inmunogénica de la reivindicación 93, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.

95. La composición inmunogénica de la reivindicación 94, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

96. La composición inmunogénica de la reivindicación 95, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.

97. Un procedimiento de reducción o de prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una bacteria de estafilococo en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 y 76 a 81 y 93 a 96 al sujeto.

98. El procedimiento de la reivindicación 97, en el que la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en Staphylococcus aureus invasivo, septicemia y estado de portador.

99. Un procedimiento de reducción o de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la etapa de administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de cualquiera

de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 y 76 a 81 y 93 a 96 al sujeto antes del procedimiento quirúrgico.

100. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 97 a 99, en el que el sujeto es un ser humano, una mascota doméstica, o un animal de ganado.

101. Un procedimiento de aislamiento de un polisacárido capsular de S. aureus con un peso molecular de 20 a 1.000 kDa que comprende la etapa de someter una célula bacteriana suspensión a un tratamiento de calor ácido.

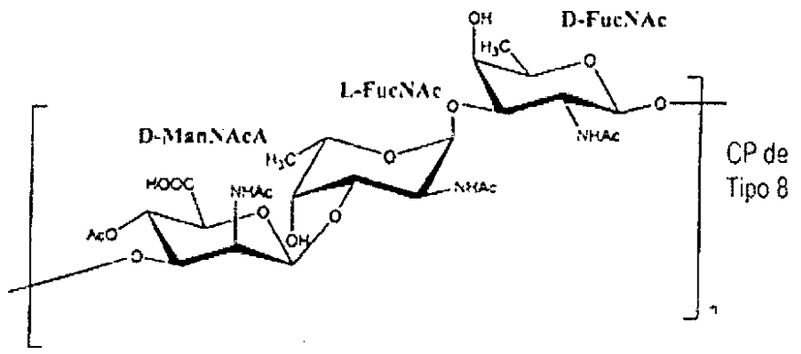
102. Un anticuerpo generado mediante un polisacárido capsular, un conjugado inmunogénico, o una composición inmunogénica de la presente invención.

103. El anticuerpo de la reivindicación 102, en el que el anticuerpo es funcional tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

RESUMEN

[0310] La presente invención se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 5 y 8 de S. aureus conjugados con proteínas portadoras y procedimientos para su preparación y uso. Los procedimientos para fabricar los conjugados inmunogénicos de la invención implican una conjugación covalente de los polisacáridos capsulares con las proteínas portadoras usando una química de conjugación que implica o bien 1,1-carboil-di-1,2,4-triazol (CDT) o bien 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH).

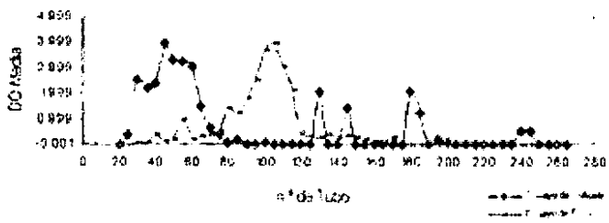
FIGURA 1



[-3)-β-D-ManNAcA(4-O-Ac)-(1-3)-α-L-FucNAc-(1-3)-α-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURA 2

A.



B.

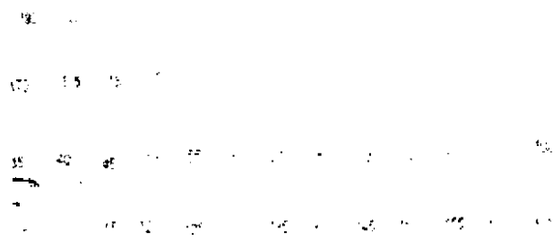
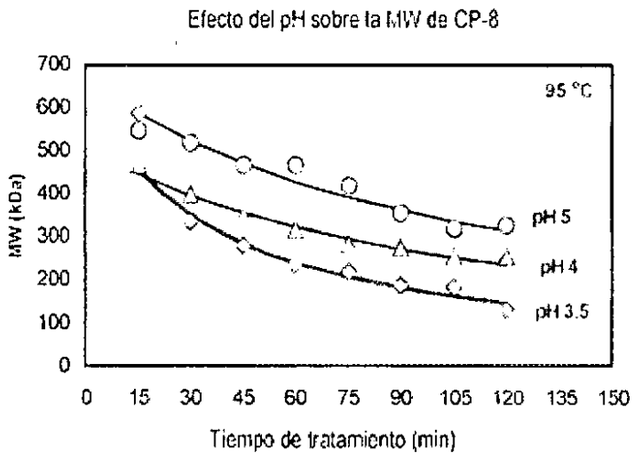


FIGURA 3

A.


Efecto del pH sobre la MW de CP-8
95 °C
pH 5
pH 4
pH 3.5
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Tiempo de tratamiento (min)

B.

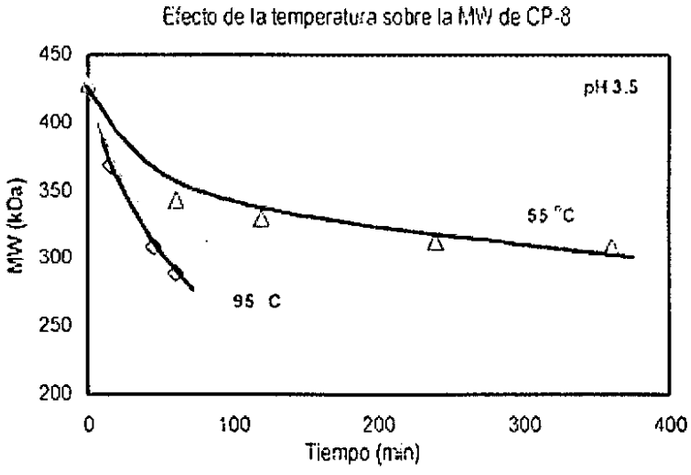

Efecto de la temperatura sobre la MW de CP-8
pH 3.5
55 °C
95 C
MW (kDa)
450
400
350
300
250
200
0 100 200 300 400
Tiempo (min)

FIGURA 4

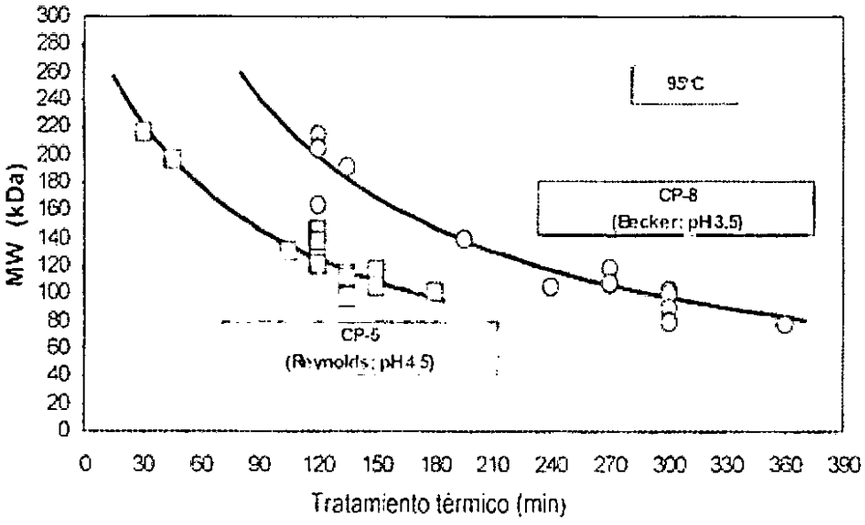

MW (kDa)
300
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
390
Tratamiento térmico (min)
95°C
CP-8
(Becker; pH3.5)
CP-5
(Reynolds; pH4.5)

FIGURA 5

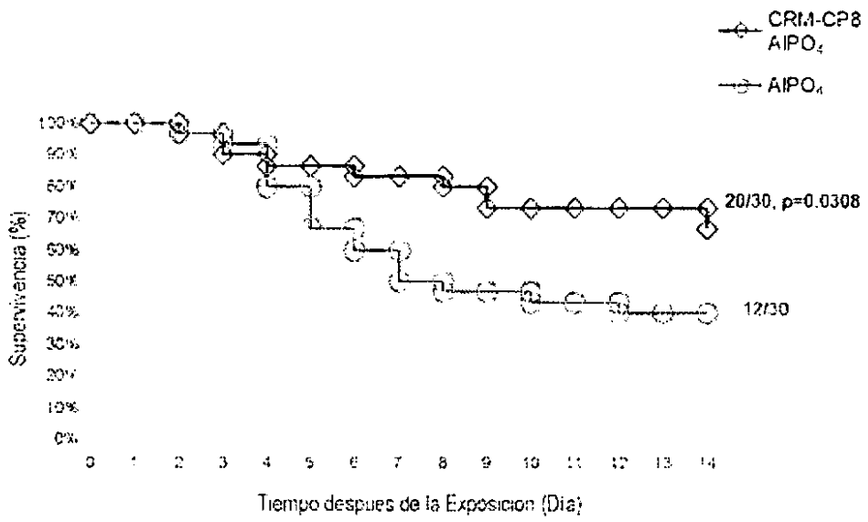
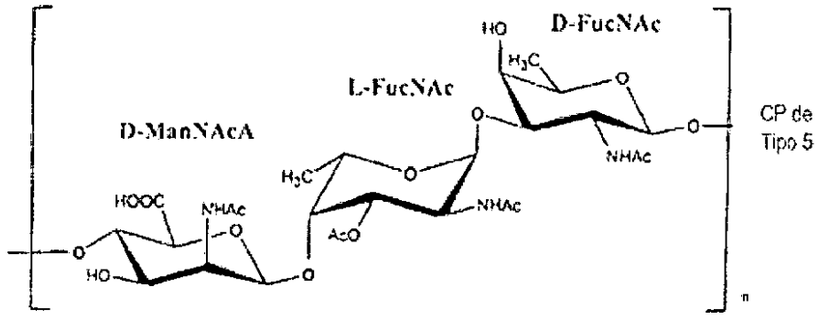

CRM-CP8 AlPO4
AlPO4
20/30, p=0.0308
12/30
Supervivencia (%)
Tiempo despues de la Exposicion (Dia)

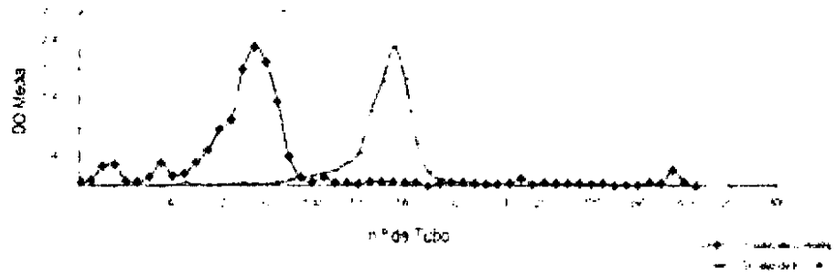
FIGURA 6



[-4)-β-D-ManNAcA-(1-4)-α-L-FucNAc(3-O-Ac)-(1-3)-β-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURA 7

A.



B.

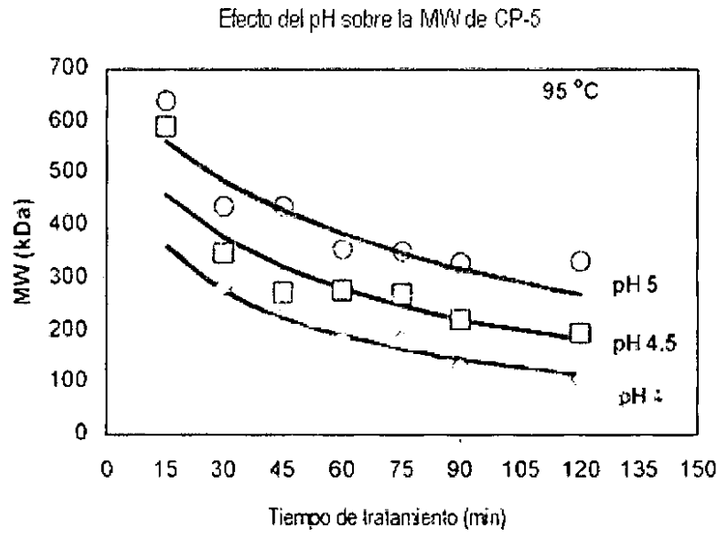
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130

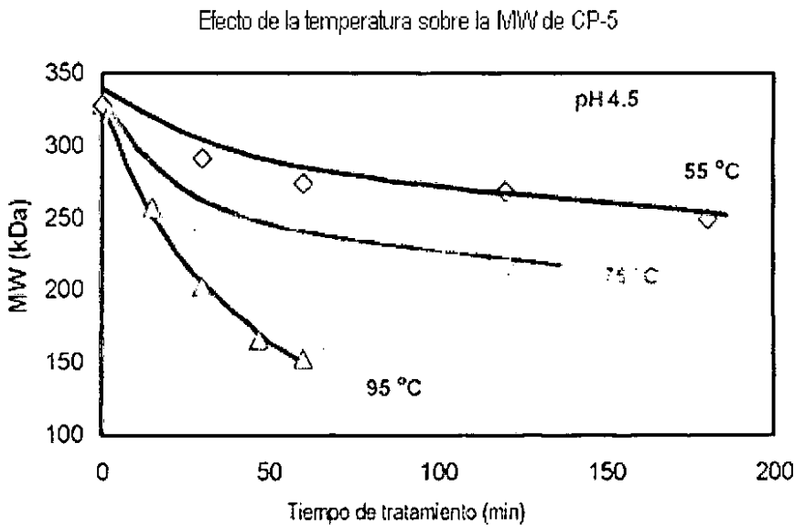
135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195

FIGURA 8

A.

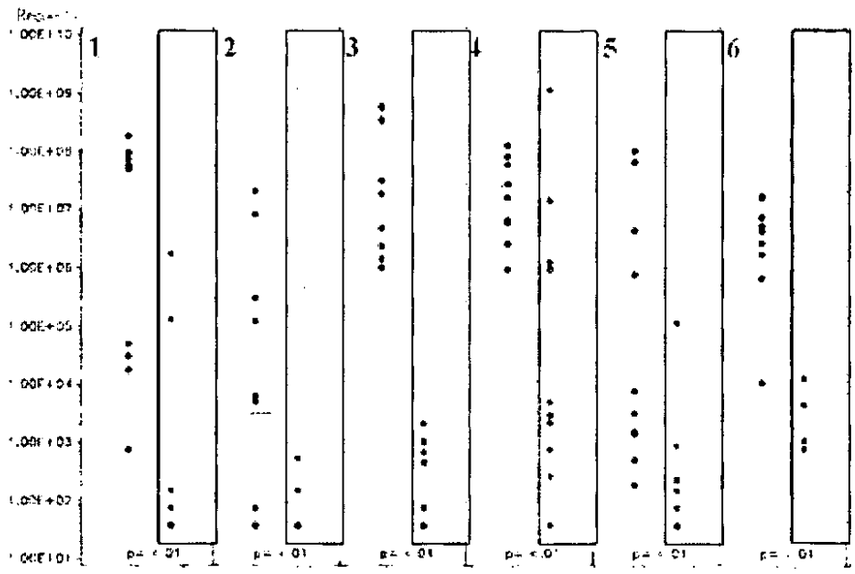


B.



256

FIGURA 9



Metanálisis p =< 0 0001

El área sombreada es el grupo inmunizado con conjugado de polisacárido de serotipo 5

FIGURA 10

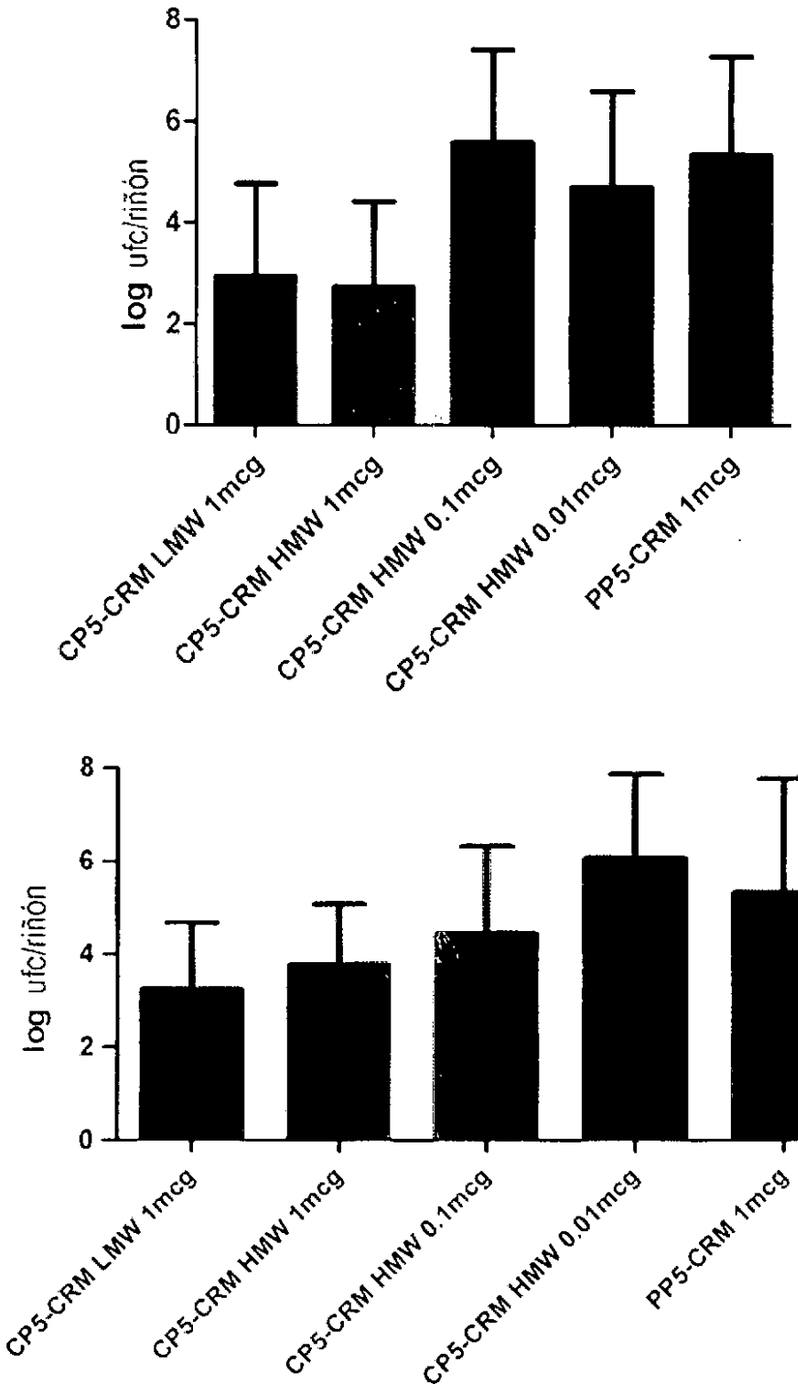
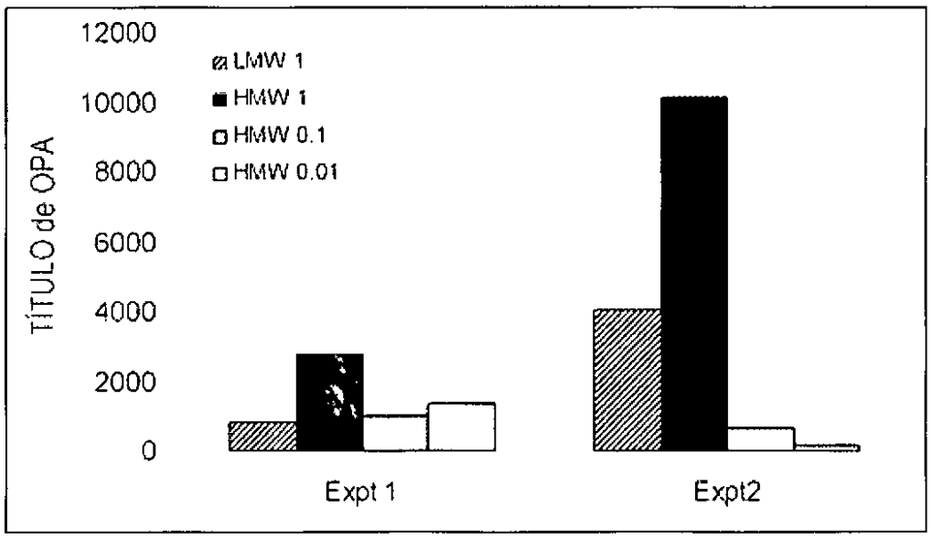

log ufc/riñón
8
6
4
2
0
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg
log ufc/riñón
8
6
4
2
0
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg

FIGURA 11


12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
TÍTULO de OPA
LMW 1
HMW 1
HMW 0.1
HMW 0.01
Expt 1
Expt2

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
PC57985A		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2010/039473	22/06/2010	22/06/2009
Applicant		
WYETH LLC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 10 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [ ] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [X] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 4
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

258

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/085 A61K47/48 C07K16/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
2 X	WO 2007/113222 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; DENOEL PHILIPPE [BE]; POOLMAN JAN [BE]) 11 October 2007 (2007-10-11) the whole document -----	1,2, 5-26, 93-100
1 X	FATTOM A I ET AL: "Development of StaphVAX(TM), a polysaccharide conjugate vaccine against S. aureus infection: from the lab bench to phase III clinical trials", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 22, no. 7, 17 February 2004 (2004-02-17), pages 880-887, XP004487442, ISSN: 0264-410X, DOI: DOI:10.1016/J.VACCINE.2003.11.034 the whole document -----	1,2, 5-26, 93-100
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 March 2011	09. 09. 2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Valcárcel, Rafael

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
2	X	WO 2006/065553 A2 (NABI BIOPHARMACEUTICALS [US]; FATTOM ALI [US]; HAUSKNECHT ED [US]; WIN) 22 June 2006 (2006-06-22) the whole document	1,2, 5-26, 93-100
2	X	WO 2004/080490 A2 (WYETH CORP [US]; PAVLIAK VILIAM [US]; BAKER STEVEN MORRIS [US]; PILLAI) 23 September 2004 (2004-09-23) the whole document	1,2, 5-26, 93-100
2	X	WO 2007/113223 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; BIEMAN) 11 October 2007 (2007-10-11) the whole document	1,2, 5-26, 93-100
2	X	WO 2006/032472 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; CASTADO CINDY [BE]; LECRENIER NICOLAS) 30 March 2006 (2006-03-30) the whole document	1,2, 5-26, 93-100
1	X	SCHAFFER A C ET AL: "Vaccination and passive immunisation against Staphylococcus aureus", INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, vol. 32, 1 November 2008 (2008-11-01), pages S71-S78, XP025560118, ISSN: 0924-8579, DOI: DOI:10.1016/J.IJANTIMICAG.2008.06.009 [retrieved on 2008-08-30] the whole document	1,2, 5-26, 93-100
1	A	JONES C: "Revised structures for the capsular polysaccharides from Staphylococcus aureus Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 340, no. 6, 2 May 2005 (2005-05-02), pages 1097-1106, XP004818368, ISSN: 0008-6215, DOI: DOI:10.1016/J.CARRES.2005.02.001 the whole document	1,2, 5-26, 93-100
2			

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039473

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
1	A	HAVAEI S A ET AL: "The capsular turnover product of Staphylococcus aureus strain Smith", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, BLACKWELL PUBLISHING, AMSTERDAM, NL, vol. 118, no. 1-2, 1 May 1994 (1994-05-01) , pages 37-43, XP023790493, ISSN: 0378-1097, DOI: DOI:10.1111/J.1574-6968.1994.TB06800.X [retrieved on 1994-05-01] the whole document	1,2, 5-26, 93-100
2	E	WO 2010/151544 A1 (WYETH LLC [US]; ANDERSON ANNALIESA [US]; PAVLIAK VILIAM [US]; JANSEN K) 29 December 2010 (2010-12-29) the whole document	1,2, 5-26, 93-100

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(completely); 5-26, 93-100(partially)

An immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated Staphylococcus aureus serotype 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein.
Methods of treating of preventing S. aureus infection comprising the step of administering a conjugate as above defined.
It is noted that claims 93-96 are dependent on claims 82-92. However, since the defined compositions are immunogenic, said claims are considered to refer to inventions 1 and 2.

---

2. claims: 3, 4(completely); 5-26, 93-100(partially)

An immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising an isolated Staphylococcus aureus serotype 5 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein.
Methods of treating of preventing S. aureus infection comprising the step of administering a conjugate as above defined.
It is noted that claims 93-96 are dependent on claims 82-92. However since the defined compositions are immunogenic, said claims are considered to refer to inventions 1 and 2.

---

3. claims: 27-49

A method of producing an immunogenic polysaccharyde-protein conjugate comprising an isolated Staphylococcus aureus serotype 8 or serotype 5 capsular polysaccharyde conjugated to a carrier protein comprising the features of claims 27 and 28 (i.e. using conjugation chemistry involving 1,1 -carboyl-di- ,2,4-triazole (CDT). It is at present unclear if there is any special technical feature linking the methods relating to each of the two recited serotypes, and thus, further lack of unity could arise in this group, should an additional search fee be paid for this group.

---

4. claims: 50-72

A method of making an immunogenic conjugate comprising an isolated Staphylococcus aureus serotype 8 or serotype 5 capsular polysaccharyde conjugated to a carrier protein comprising the features of claims 50 and 51 (i.e. using conjugation chemistry involving 3-(2-pyridy)dithio)-propiony) hydrazide (PDPH)). It is at present unclear if there is any special technical feature linking the methods relating to each of the two recited serotypes, and thus, further lack of unity could arise in this group, should an additional search fee be paid for this

group.

---

5. claims: 73-81(completely); 97-100(partially)

An immunogenic conjugate produced by the method of any of claims 27-72. It is noted that this group makes reference to the products produced by the methods of groups of inventions 3 and 4. This group of inventions comprises an immense variety of conjugates which are likely to be known and thus, further lack of unity is to be expected should an additional search fee be paid for this group. First, products defined by the process of manufacture are not considered clear whenever it is possible to define the product by structural features. A product is not rendered novel by the mere fact that a new method is used to produce said product. As a service to the applicant, the present authority notes that this group of inventions on top of the further lack of unity will upon examination very likely result in objections of lack of clarity and lack of novelty.
Just for the sake of completeness the medical uses associated to said products are listed under this group of inventions, but the same arguments as just recited also apply.

---

6. claims: 82(completely); 84-92(partially)

A S. aureus Type 8 capsular polysaccharide having a molecular weight of between 20 kDa and 1000 kDa covalently bound to a carrier protein; wherein the combined molecular weight of the polysaccharide covalently bound to the carrier protein is between about 200 kDa and 5000 kDa.
It is noted that group 1 refers to similar subject mutter as present group 6, but in group 1 the conjugates are immunogenic and in group 6 the conjugates are not required to be immunogenic. The present authority can not foresee how the S. aureus Type 8 CPs of such a broad molecular weight as claimed (between 20 kDa and 1000 kDa) can not be immunogenic, thus if the Applicant intends to refer to the non immunogenic conjugates, then group 6 will lack support in the description and will not be sufficiently disclosed.
If the claims are identical in scope to these of group 1 (if the immunogenicity is an intrinsic feature), then the claims of group 6 have to be considered unclear (lack of conciseness).
It is noted that claims 93-96 are dependent on claims 82-92, however, since the defined compositions are immunogenic, these claims are grouped under inventions 1 and 2.

---

7. claims: 83(completely); 84-92(partially)

A S. aureus Type 5 capsular polysaccharide having a molecular weight of between 20 kDa and 1000 kDa covalently

bound to a carrier protein; wherein the combined molecular weight of the polysaccharide covalently bound to the carrier protein is between about 200 kDa and 5000 kDa.
It is noted that group 2 refers to similar subject mutter as present group 7, but in group 2 the conjugates are immunogenic and in group 7 the conjugates are not required to be immunogenic. The present authority can not foresee how the S. aureus Type 5 CPs of such a broad molecular weight as claimed (between 20 kDa and 1000 kDa) can not be immunogenic, thus if the Applicant intends to refer to the non immunogenic conjugates, then group 7 will lack support in the description and will not be sufficiently disclosed.
If the claims are identical in scope to these of group 2 (if the immunogenicity is an intrinsic feature) the claims of group 7 have to be considered unclear (lack of conciseness).
It is noted that claims 93-96 are dependent on claims 82-92. However, since the defined compositions are immunogenic, the claims are grouped under inventions 1 and 2.

---

8. claim: 101

A method of isolating S. aureus capsular polysaccharide with molecular weight from 20-1000 kDa comprising the step of subjecting a bacterial cell suspension to an acidic heat treatment.

---

9. claims: 102, 103

An antibody as defined in claims 102 and 103 generated by a capsular polysaccharide, an immunogenic conjugate or an immunogenic composition "of the present invention". This group of inventions is not clear since merely reciting "the present invention" does not refer to any technical feature.
It is also noted that since the claims include an antibody generated to the conjugate, also antibodies recognizing the carrier protein (any protein) are included under the scope of these claims.Thus, further lack of unity can be expected should an additional search fee be paid for this group since at least claim 102 is not novel.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/039473

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 2(completely); 5-26, 93-100(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee,

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/039473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007113222 A2	11-10-2007	AU 2007233705 A1	11-10-2007
		AU 2011201158 A1	07-04-2011
		BR PI0710210 A2	24-05-2011
		CA 2647441 A1	11-10-2007
		EA 200801839 A1	28-08-2009
		EP 1998802 A2	10-12-2008
		JP 2009531387 A	03-09-2009
		KR 20080111115 A	22-12-2008
		MA 30343 B1	01-04-2009
		US 2010021503 A1	28-01-2010
WO 2006065553 A2	22-06-2006	AR 052541 A1	21-03-2007
		AU 2005316864 A1	22-06-2006
		CA 2591442 A1	22-06-2006
		CN 101132810 A	27-02-2008
		EP 1846025 A2	24-10-2007
		JP 2008523142 A	03-07-2008
		KR 20070090011 A	04-09-2007
		NZ 556533 A	31-05-2009
		US 2006134141 A1	22-06-2006
WO 2004080490 A2	23-09-2004	AU 2004220590 A1	23-09-2004
		BR PI0408167 A	21-03-2006
		CA 2517439 A1	23-09-2004
		CN 1787839 A	14-06-2006
		EP 1601381 A2	07-12-2005
		JP 2006519870 A	31-08-2006
		KR 20060035581 A	26-04-2006
		MX PA05009351 A	08-03-2006
		NZ 561879 A	31-05-2009
		US 2007141077 A1	21-06-2007
		ZA 200508086 A	28-04-2010
WO 2007113223 A2	11-10-2007	AR 060187 A1	28-05-2008
		AR 060188 A1	28-05-2008
		CA 2647450 A1	11-10-2007
		CA 2647455 A1	11-10-2007
		EP 2019689 A2	04-02-2009
		EP 2026841 A2	25-02-2009
		WO 2007113224 A2	11-10-2007
		JP 2009531388 A	03-09-2009
		JP 2009531389 A	03-09-2009
		US 2010303852 A1	02-12-2010
		US 2010322959 A1	23-12-2010
WO 2006032472 A2	30-03-2006	AU 2005287502 A1	30-03-2006
WO 2006032472 A2		AU 2005287505 A1	30-03-2006
		AU 2005287532 A1	30-03-2006
		BR PI0515516 A	29-07-2008
		BR PI0515520 A	29-07-2008
		CA 2580103 A1	30-03-2006
		CA 2580137 A1	30-03-2006
		CA 2584290 A1	30-03-2006
		EP 1793849 A2	13-06-2007
		EP 1804833 A2	11-07-2007
		EP 1791559 A2	06-06-2007
		EP 2181714 A2	05-05-2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/039473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2298340 A1	23-03-2011
		EP 2305294 A1	06-04-2011
		EP 2305295 A1	06-04-2011
		EP 2305296 A1	06-04-2011
		WO 2006032475 A2	30-03-2006
		WO 2006032500 A2	30-03-2006
		JP 2008513406 A	01-05-2008
		JP 2008513409 A	01-05-2008
		KR 20070054732 A	29-05-2007
		KR 20070058631 A	08-06-2007
		MA 28994 B1	01-11-2007
		MA 28995 B1	01-11-2007
		NZ 553775 A	28-05-2010
		NZ 553776 A	28-05-2010
		US 2008095777 A1	24-04-2008
		US 2008085289 A1	10-04-2008
		US 2011008385 A1	13-01-2011
WO 2010151544 A1	29-12-2010	PE 00232011 A1	31-01-2011

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-177205- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:29:32 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 262

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐