TÍTULO DE LA INVENCIÓN

PROCESO MEJORADO PARA LA CONJUGACIÓN Y CONJUGADOS SINTÉTICOS DE OLIGOSACARIDO-PROTEINA NOVEDOSOS OBTENIDOS DEL MISMO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de la conjugación para obtener conjugados sintéticos novedosos de oligosacáridos - proteínas (OS - PR). La presente invención también se refiere a nuevos conjugados de OS-PR sintéticos para la preparación de nuevas vacunas conjugadas en donde dichos oligosacáridos son oligosacáridos sintéticos.

FUNDAMENTO DE LA INVENCIÓN

Los oligosacáridos que corresponden a una pequeña fracción de polisacáridos capsulares bacterianos naturales son reconocidos por anticuerpos dirigidos contra antígenos de polisacáridos nativos de alto peso molecular. Los oligosacáridos dan posibilidades prometedoras como candidatos principales para, ya que no sólo son inmunogénicos, sino también pueden funcionar como haptenos en sus conjugados de proteínas que pueden producir anticuerpos específicos en modelos animales y en seres humanos. Los avances en el campo de la investigación biológica y tecnología de vacunas sintéticas orgánicas de nueva generación han proporcionado ensamblaje químico más eficaz de los fragmentos de oligosacáridos complejos en el laboratorio de síntesis orgánica que generalmente están disponibles en y se purifican a partir de la superficie de bacterias patógenas.

Los conjugados obtenidos a partir de polisacáridos naturales se han desarrollado con éxito como vacunas humanas. Sin embargo, su uso está asociado con problemas tales como la variación significativa en el tamaño y las propiedades de polisacáridos bacterianos, la destrucción de características inmuno-dominantes vitales durante la conjugación química con una proteína vehículo, la visualización de heterogeneidad significativa en los conjugados y la presencia de componentes altamente tóxicos y otras impurezas de la célula huésped que pueden ser difíciles de eliminar. La síntesis orgánica puede proporcionar epítopos de hidratos de carbono con alta pureza y en cantidades relativamente grandes para

la conjugación controlada a una proteína portadora. En este enfoque, los sacáridos sintéticos están equipados con un separador artificial para facilitar la conjugación selectiva con una proteína portadora.

El advenimiento de las vacunas conjugadas contra enfermedades asociadas con Haemophilus influenzae tipo b han abierto una nueva era en la vacunología. Uno de los principales hitos en el desarrollo de vacunas de nueva generación es el desarrollo de conjugados de proteína eficaces de fragmentos sintéticos del oligosacárido capsular de Haemophilus influenzae tipo b en la prevención de la meningitis infantil y otras enfermedades. Las cuestiones clave relacionadas con el desarrollo de oligosacáridos sintéticos y sus conjugados son múltiples como el tamaño de epítopo, el número de copias de oligosacáridos por proteína en el conjugado, el posible efecto del espaciador en la respuesta inmune, y la adecuada elección de la proteína portadora combinada con la selección del modelo animal.

Teniendo en cuenta el hecho de que el oligosacárido sintético proporciona los compuestos principales eficaces para la investigación biológica, específicamente en el campo de la tecnología de vacunas, la investigación significativa e curso para la preparación de los oligosacáridos sintéticos y sus conjugados de proteínas. Sin embargo, no existe un protocolo general para la preparación del oligosacárido de la importancia biológica. La síntesis química de cada molécula conjugada principal es un proyecto de investigación que conlleva experimentación larga y sistemática. El tiempo total de proceso documentado en la técnica anterior desde la materia prima al producto tarda 20-24 horas. El rendimiento más bajo, menos estabilidad y menos pureza del oligosacárido convencional y su conjugado de proteína son los principales motivos de preocupación. Por lo tanto, hay una urgente necesidad largamente sentida de tener conjugados sintéticos de oligosacáridos-proteínas con una mayor estabilidad acoplados con homogeneidad y un proceso de conjugación OS-PR sintética eficiente para obtener tales vacunas conjugadas sintéticas con un mejor rendimiento, estabilidad y pureza. La asequibilidad y la disponibilidad de las vacunas conjugadas sintéticas es un problema importante que requiere un proceso que permite la

disponibilidad de vacunas conjugadas sintéticas de una manera efictiva en cuanto a tiempo y eficaz en costo.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

Con el fin de obviar los inconvenientes del estado de la técnica actual, el objeto principal de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado de conjugación para obtener conjugados síntéticos novedosis de oligosacáridos-proteínas (OS-PR).

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado de síntesis de conjugación OS-PR en el que dicho proceso permite mayor rendimiento, mayor pureza y mayor estabilidad de los conjugados de oligosacáridos-proteínas.

Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado de conjugación sintética de OS-PR en donde dicho proceso es rápido y conveniente para la conjugación de dicho oligosacárido y proteína portadora.

Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado de costo efectivo de conjugación sintética OS-PR para obtener conjugados asequibles de oligosacáridos-proteínas.

Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos conjugados sintéticos de OS-PR para la preparación de nuevas vacunas conjugadas.

Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos conjugados sintético OS- PR en donde los oligosacáridos son oligosacáridos sintéticos.

Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar conjugados sintéticos OS-PR en el que dichos conjugados de oligosacáridos-proteínas provocan respuesta inmune específica y homogénea.

Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos conjugados sintéticos OS- PR para la preparación de nuevos conjugados sintéticos basados en oligosacáridos utilizados ya sea como vacunas monovalentes o como vacunas de combinación, y también como herramientas de diagnóstico.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado de la conjugación para obtener nuevos conjugados OS-PR sintéticos. El proceso de la conjugación sintética OS-PR de presente invención es un proceso rápido que proporciona conjugados OS-PR que producen respuestas inmunes altas, monoespecíficas y homogéneas. Los conjugados producidos de este modo dan resultados reproducibles que mejoran la fiabilidad de las vacunas y diagnósticos basados en estos conjugados.

Los nuevos conjugados OS-PR sintéticos obtenidos con el proceso de la presente invención producen nuevas vacunas conjugadas basadas de oligosacáridos sintéticos.

Dichos conjugados sintéticos son sintéticos porque la parte de oligosacárido de los conjugados OS-PR sintéticos es un oligosacárido sintético, mientras que la proteína portadora se obtiene a partir de bacterias gram positivas.

La presente invención implica la selección de una longitud adecuada de oligosacárido sintético, preferiblemente tetrámero y octámero de oligosacárido (oligómero de aquí en adelante), que se modifica para la conjugación con la proteína. La modificación comprende

las etapas de adición de un enlazador a ese oligómero, la activación de dicho oligómero usando un agente de tiolación seguido de la purificación de dicho oligómero activado (es decir oligómero tiolado). Por otra parte, una proteína bacteriana adecuada, preferiblemente pero no limitado a toxoide tetánico, se modifica por la activación. El citado oligómero tiolado se conjuga con dicha proteína bacteriana activada.

El enlazador incorporado en dicho oligómero proporciona el grupo amino (-NH2) en el extremo terminal de dicho oligómero. El dicho grupo amino terminal (-NH2) es fácilmente disponible para la activación con el agente de tiolación. El agente de tiolación se selecciona de un grupo de reactivos tales como, pero no limitado a ácido tioacético y S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA), preferiblemente SATA. El compuesto sulfhidrilado se trata después con nucleófilo seleccionado del grupo de agentes reductores para obtener el oligómero activado que luego se purifica. El ensayo se lleva a cabo para determinar las unidades de tiol por unidades de oligosacáridos.

Dicha proteína se activa usando un agente reticulador tal como el éster de N-(beta-maleimido propiloxy) succinimida (BMPS). Dicho oligosacárido activado y dicha proteína activada se mantienen en ciertas condiciones experimentales, tales como temperatura específica para el momento específico para la conjugación.

La química de conjugación de dicho conjugado de oligosacárido-proteína de la presente invención es el enlace tio-éter.

La presente invención proporciona la conjugación sintética en la que el tiempo de proceso completo está en el intervalo de 14-22 horas. La presente invención no requiere la purga de nitrógeno y utiliza los reactivos para los cuales no se requieren habilidades especiales de manipulación, con lo que se hace el proceso conveniente y rentable.

La presente invención proporciona los conjugados sin ninguna modificación de la estructura oligomérica precursora, manteniendo así todos los epítopos intactos para generar la respuesta inmune natural.

La relación de oligosacáridos y proteínas tiene un papel crítico en la generación de la respuesta inmune. La presente invención proporciona la obtención de una mayor carga de oligosacáridos en la proteína para obtener una relación OS:PR deseada entre 0,2 y 0,5 para Haemophilus influenzae tipo b (Hib) y meningitidis Neisseria serogrupos A, C, Y, W135 o X (MenA, MenC, MenY, MenW o MenX, respectivamente). El rendimiento global de la conjugación del conjugado de oligosacárido-proteína es de aproximadamente 45% a 65% para Hib y 21% a 48% para los serogrupos MenA/C/Y/ W/X. La presente invención también utiliza N- succinimidil S-acetiltioacetato (SATA) para la activación de oligómeros. SATA es soluble en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y permite una rápida mezcla de oligosacárido con el agente de tiolación en buffer, facilitando así el proceso. La presente invención también proporciona el proceso de conjugación sintética en el que la purificación de un solo paso se lleva a cabo, lo que reduce los pasos en el proceso, resultando en un mejor rendimiento y tiempo de proceso menor.

El procedimiento mejorado de la presente invención es útil para la preparación de una serie de conjugados útiles en la preparación de vacunas. Unos pocos ejemplos no limitantes de tales conjugados OS- TT son conjugado Hib-TT, conjugado MenX-TT, conjugado MenC-TT, conjudado MenA-TT, conjugado MenW-TT, conjugado MenY-TT, conjugado Hib-CRM197, conjugado MENX -CRM197, conjugado MenC-CRM197, conjugado MenA-CRM197, conjugado MenW-CRM197, conjugado MenY-CRM197. La vacuna se puede preparar ya sea como vacuna única o como vacunas de combinación.

De los muchos ejemplos en los que puede utilizarse el proceso de síntesis de conjugación OS-PR, en un ejemplo no limitativo, dicho oligómero preparado sintéticamente está ligado con el enlazador de hexailamina y activado usando (N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), en el que dicho SATA se disuelve en sulfóxido de dimetilo (DMSO). El

oligosacárido sulfhidrilado así obtenido se somete a condiciones predeterminadas por un período determinado a una tasa de flujo muy baja y luego se purifica. Dicho oligómero purificado luego se concentra y se hace reaccionar con al menos un nucleófilo tal como hidrocloruro de hidroxilamina para obtener el oligosacárido tiolado.

Una solución de éster de N-(beta-maleimido propiloxy) succinimida en N-metil-2-pirrolidona (NMP) se mezcla con una proteína portadora ej., toxoide de tétanos (TT) (obtenido a partir de Clostridium tetani) o CRM197 (mutante de reacción cruzada o mutante no tóxico de la toxina diftérica y también se conoce como CRM en la memoria descriptiva) y se mantuvo en condiciones predeterminadas durante un período fijo. La mezcla de reacción de dicha proteína portadora activada a continuación se purifica y recolecta.

La proteína portadora esterificada o activada y dicho oligómero tiolado se mezclan y se incuban durante la noche a condiciones predeterminadas. El volumen de conjugado de oligómero-proteína se purifica utilizando filtros de ultracentrifugación u otros dispositivos de exclusión por tamaño ej., cromatografía de filtración en gel.

El resultado más importante del proceso mejorado de la presente invención es proporcionar conjugados de oligosacáridos-proteínas tales como, pero no limitados a a conjugados MenA-TT, MenC-TT, MenX-TT, MenY-TT, MenW-TT, Hib-TT a partir de conjugación OS-PR sintética con resultados reproducibles. Dicho conjugado de oligosacárido-proteína produce la respuesta inmune específica y homogénea y es útil en la producción de vacunas monovalentes o vacunas de combinación multivalentes y como herramienta de diagnóstico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig-1 ilustra colectivamente la representación esquemática de las estructuras de oligómeros sintéticos de diferentes serogrupos meningococales. Fig la: Men A, Fig 1b:

MenC, Fig 1c: MenY, Fig 1d: MenW $_{135}$ y la figura 1e: MenX con amina terminal que contiene enlazador.

La Fig. 2A ilustra una representación esquemática del proceso de activación de oligómeros para generar el grupo tiol terminal reactivo.

La Fig. 2b representa un diagrama esquemático que muestra la activación de la proteína portadora para generar el grupo maleimida reactivo frente a tioles.

La Fig. 2c representa un diagrama esquemático que muestra la conjugación del oligómero sintético tiolado a la proteína portadora marcada con maleimida a través de enlace tio-éter.

Las Figs 3a y 3b representan el perfil pico HP-SEC de oligómero conjugado $(MenC)_4$ o $(MenC)_8$ en comparación con la proteína activada (TT & CRM), como se observa en el detector UV/PDA Waters.

La Fig. 3c representa el perfil pico HP-SEC del tetrámero Hib conjugado en comparación con la proteína activada, como se observa en el detector UV/PDA Waters.

La Fig. 3d representa el perfil pico HP-SEC del tetrámero MenX conjugado en comparación con la proteína activada, como se observa en el detector UV/PDA Waters.

La Fig. 4 representa las propiedades antigénicas in vitro del conjugado $(MENX)_4$ y $(MENX)_4$-TT como se muestra en términos de porcentaje de inhibición de los anticuerpos generados contra polisacárido MenX bacteriano.

La Fig. 5a ilustra la respuesta inmunológica con respecto a concentraciones séricas de IgG anti-MenC en ratones albinos Swiss despuésn de 1,2 y 3 dosis de conjugados MenC sintéticos según se estimó mediante ELISA.

La Fig. 5b ilustra la respuesta inmunológica después de 3 dosis en relación con títulos del ensayo bactericida en suero anti- MenC para conjugados $(MenC)_4$-TT.

La Fig. 5c ilustra la respuesta inmunológica después de 3 dosis en relación con títulos del ensayo bactericida en suero anti- MenC para conjugados $(MenC)_8$-TT.

La Fig. 5d representa las respuestas inmunológicas con respecto a la respuesta IgG anti-MenX estimada por ELISA en suero y títulos bactericidas séricos después de 3 dosis de conjugados sintéticos $(MENX)_4$-TT en ratones albinos suizos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN CON ILUSTRACIONES Y EJEMPLOS

En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado de conjugación para la preparación de conjugados sintéticos de oligosacáridos-proteínas útiles en la preparación de vacunas.

Unos pocos ejemplos no limitantes de tales conjugados son conjugado Hib-TT, 30 conjugado MenX-TT, conjugado MenC-TT, conjugado MenA-TT, conjugado MenW-TT, conjugado MenY-TT, conjugado Hib-CRM197, conjugado MenX-CRM197, conjugado MenC-CRM197, conjugado MenA-CRM197, conjugado MenW- CRM 197, conjugado MenY-CRM 197. La vacuna se puede preparar ya sea como vacunas monovalentes o como vacunas de combinación.

La presente invención implica la selección de un oligómero sintético adecuado, preferiblemente tetrámero oligosacárido y octámero, el oligosacárido sintético que comprende al menos un enlazador amino terminal incorporado, dicho oligosacárido sintético imita el polisacárido natural obtenido a partir de bacterias gram negativas tales como meningitidis Neisseria serogrupo A, C, Y, W135, X (Fig. la, lb, lc, Id, le) y Haemophilus influenzae con enlazador amino terminal (-NH2). Dicho grupo amino terminal (-NH2) es fácilmente disponible para la activación con el agente de suflhidrilate. El agente sulfhidrilante que facilita la conversión del enlazador amino terminal al grupo sulfhidrilo, se selecciona de un grupo de reactivos tales como, pero no limitados a, anhídrido acético, cloruro de acetilo, tiolactona de N-acetilhomocisteína, tiolactona de homocisteína, ácido tioacético y N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), preferiblemente SATA. SATA se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) y se agita con la solución de dicho oligosacárido sintético durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se aplica luego a cromatografía de filtración en gel, equilibrada con buffer HEPES pH ~ 7.5 para eliminar cualquier SATA sin reaccionar. Dicho oligomero modificado por SATA se mezcla a continuación a temperatura ambiente durante 2 horas con nucleófilos seleccionados de un grupo de agentes reductores, preferiblemente hidrocloruro de hidroxilamina para facilitar la conversión del grupo sulfhidrilo al grupo tiol reactivo (Fig. 2a). La determinación del contenido de oligosacáridos se lleva a cabo para MenC, Y y W mediante el ensayo Resorcinol, para MenX y A mediante el ensayo de Chen y para Hib mediante el ensayo Orcinol. El contenido de Tiol (-SH) se determina mediante el ensayo Ellman para todos los tipos de oligómeros. El grado (%) de tiolación se determina dividiendo la concentración de tiol mediante la concentración de oligómero sobre una base molar.

Una proteína portadora bacteriana adecuada, preferiblemente pero no limitada a toxoide tetánico (TT) y mutante de reacción cruzada (CRM197 o simplemente CRM) o su versión recombinante se activa para generar el grupo funcional de maleimida reactiva. Dicha proteína portadora se activa mediante un reticulador heterobifuncional alifático preferiblemente pero no limitado a éster de N-(beta-maleimido propiloxi) succinimida

(BMPs). Dicha proteína portadora por ejemplo, TT y CRM197 en buffer HEPES pH ~ 7,6 y mezclada a temperatura ambiente con dicha solución de BMPs en N-metil-2-pirrolidona (NMP) durante 2 horas. La mezcla de reacción de dicha proteína portadora luego se lava 6-7 veces con buffer PBS pH ~ 6.8 a través de filtros centrífugos de corte adecuados (Fig. 2b). El contenido de proteína de dicha proteína portadora activada se determina por el método de Lowry utilizando BSA como estándar. El contenido de maleimida se estima indirectamente mediante el ensayo de Ellman, donde la proteína portadora marcada con maleimida primero se hace reaccionar con una cantidad conocida de p-mercaptoetanol y el p-mercaptoetanol sin reaccionar se analiza por DTNB. El número de grupos de maleimida por unidad de proteína portadora se calcula utilizando la concentración molar de la proteína portadora y la concentración molar de la maleimida.

El oligosacárido tiolado seleccionado del grupo de bacterias gram negativas tales como meningitidis Neisseria serogrupo A, C, Y, W135, X y Haemophilus influenzae tipo b en buffer HEPES pH ~ 7.5 y dicha proteína portadora activada marcado con maleimida selecciona del toxoide tetánico (TT) y el mutante de reacción cruzada (CRM197) en buffer PBS pH ~ 6.8 se mezclan juntos para la conjugación. La mezcla de reacción que tiene un pH en el rango de 6.5 a 7.5 se agita suavemente durante la noche, preferiblemente a 2-8 °C, aunque esto se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. El conjugado crudo se purifica por lavado 6-7 veces con buffer MES pH ~ 6.5 a través de filtros centrífugos de 50 kD de corte para eliminar el oligómero no conjugado y las impurezas como clorhidrato de hidroxilamina sin reaccionar. Los conjugados purificados de oligosacáridos-proteínas se filtran a través de filtros de 0.2 µ y se almacenan a 2-8 °C hasta su uso (figura 2c.). La química de conjugación de dicho conjugado de oligosacárido-proteína de la presente invención es el enlace tio-éter.

Los conjugados de oligosacárido-proteína obtenidos de dicho proceso mejorado de conjugación se caracterizan además para análisis fisicoquímico tales como el contenido de proteínas, contenido de oligosacáridos, relación de proteína oligosacárido, el contenido de oligosacárido libre por procedimientos estándar. Los conjugados se analizan por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC) para observar la conversión de los reactivos en el conjugado y la distribución de tamaño molecular (Fig. 3a,

3b, 3c, 3d). Se realizan estudios para probar antigenicidad (Fig. 4) y la inmunogenicidad animal de los conjugados de oligosacáridos-proteínas obtenidos de este modo (Fig. 5a, 5b, 5c, 5d).

La presente invención proporciona la conjugación sintética en la que el tiempo de proceso completo está en el intervalo de 14-22 horas. La presente invención no requiere la purga de nitrógeno y utiliza los reactivos para los cuales no se requieren habilidades especiales de manipulación, con lo que se hace el proceso conveniente y rentable.

La presente invención proporciona los conjugados sin ninguna modificación de la estructura oligomérica precursora, manteniendo así todos los epítopos intactos para generar la respuesta inmune natural. La presente invención también proporciona el proceso de conjugación sintética en el que la purificación de un solo paso se lleva a cabo, lo que reduce los pasos en el proceso, resultando en un mejor rendimiento y tiempo de proceso menor.

El resultado más importante del proceso mejorado de la presente invención es proporcionar un conjugado de oligosacárido-proteína tales como, pero no limitado a conjugado Hib-TT, conjugado MenX-TT, conjugado MenC-TT, conjugado MenA-TT, conjugado MenW-TT, conjugado MenY-TT, conjugado Hib-CRM197, conjugado MenX-CRM197, conjugado MenC-CRM 197, conjugado MenA-CRM 197, conjugado MenW-CRM 197, conjugado MenY-CRM197 a partir de la conjugación sintética de OS-PR con resultados reproducibles. Dichos conjugados de oligosacáridos-proteínas producen la respuesta inmune específica y homogénea y son útiles en la producción de vacunas monovalentes o vacunas de combinación multivalentes y como herramienta de diagnóstico.

Ejemplo 1: La activación y el análisis de oligómero (MenA, MenC, MenY, MenW, MENX y Hib) para generar el grupo funcional tiol reactivo

La solución de oligosacárido sintético a la concentración de 10 mg / ml en tampón HEPES 0,1 M que contiene NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, pH 7,5, se ha mezclado con una solución de un exceso molar de 2,5 veces de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido S-acetiltioglicólico (SATA) en dimetilsulfóxido. La solución ha sido agitada suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente. El SATA reacciona con la amina presente en la cadena de engarce de los oligómeros sintéticos para formar un intermedio acetilado para la generación de grupos tiol reactivos en la segunda etapa de reacción. La mezcla de reacción se ha aplicado a cromatografía de filtración en gel sobre una columna de Sephadex G-10 (GE Healthcare) (volumen de lecho de 20 a 30 ml), equilibrada con tampón HEPES 0,1 M que contiene NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, a pH 7,5 para eliminar cualquier SATA sin reaccionar. El oligómero que reaccionó que se ha recogido en 4,0 ml de eluyente en el modo isocrático usando tampón equilibrado, que se ha concentrado posteriormente a 500 pi. El oligómero modificado con SATA así obtenido ha sido mezclado con una solución de hidrocloruro de hidroxilamina en una concentración de aproximadamente 35 exceso molar de oligómero tiolado en tampón HEPES 0,1 M que contiene NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, a pH 7,5. Después de 2 horas la mezcla a temperatura ambiente, el oligómero tiolado se ha almacenado a - 20 °C hasta su uso posterior. El diagrama esquemático de la activación del oligómero se muestra en la Fig. 2a. Dos anómeros diferentes de tetrámero MenX se usaron es decir, un anómero alfa (aXTM) y anómero beta (pXTM) para la activación y conjugación.

El oligómero activado es luego purificado y analizado para el contenido de oligosacáridos y el contenido de tiol.

Para MenC, MenY y MenW el contenido de oligosacáridos se ha determinado mediante el ensayo de resorcinol utilizando ácido N-acetil neuramínico (NANA) como un estándar, para MenA y MenX por el ensayo de Chen utilizando fósforo como un estándar y Hib mediante el ensayo de Orcinol usando ribosa como una estándar. El contenido de tiol (SH) se ha determinado mediante el ensayo de Ellman. El porcentaje de tiolación se obtiene dividiendo la concentración de tioles mMolar por la concentración mMolar de oligómero.

Unos resultados representativos de experimentos de activación de oligómeros se proporcionan en la Tabla 1, 2, 3 y 4.

Tabla 1: La activación de tetrámero sintético de MenC $(MenC)_4$ para generar grupo tiol reactivo

Sr.	**Lote No de $(MenC)_4$ tiolado**	**-SH/$(Hib)_4$ (mol/mol)**	**% de recuperación de $(MenC)_4$ (Escala de reacción)**
1	CTM001	0.66	56 (8 mg)
2	CTM002	0.43	87 (5 mg)
3	CTM003	0.63	58 (5 mg)
4	CTM004	0.66	62 (10 mg)
5	CTM005	0.55	70 (10 mg)
6	CTM006	0.60	86 (7 mg)
7	CTM007	0.56	70 (7 mg)
8	CTM008	0.60	70 (7 mg)
9	CTM009	0.67	55 (15 mg)
10	CTM010	0.60	70 (9 mg)

Tabla 2: Activación de octámero sintético de MenC $(MenC)_8$ para generar grupos tiol reactivos

Sr.	**Lote No de $(MenC)_8$ tiolado**	**-SH/$(OS)_4$ (mol/mol)**	**% de recuperación $(MenC)_8$ (Escala of reacción)**
1	COM001	0.74	70 (9.5 mg)
2	COM 002	0.72	69 (16mg)
3	COM 003	0.88	64 (9mg)
4	COM 004	0.62	56 (9mg)
5	COM 005	0.31	60 (18mg)
6	COM 006	0.43	40 (25mg)
7	COM007	0.58	77(9 mg)
8	COM 008	0.64	70 (9mg)
9	COM 009	0.58	66 (9mg)
10	COM010	0.68	49 (34mg)
11	COM011	0.57	73 (lOmg)

Tabla 3: Activación de tetrámero sintético de MENX $(MENX)_4$ para generar el grupo tiol reactivo

Sr.	**Lote No de $(MenX)_4$ tiolado**	**-SH/$(OS)_4$ (mol/mol)**	**% de recuperación de $(MenX)_4$ (Escala de Reacción)**
1	βXTM001	0.92	70 (5mg)
2	βXTM002	0.72	65 (8.5mg)
3	αXTMOOl	0.70	76 (15mg)
4	αXT M 002	0.54	83 (18.5mg)
5	αXT M 003	0.64	89 (18mg)

Tabla 4: Activación de tetrámero sintético de Hib $(Hib)_4$ para generar grupo tiol reactivo

Sr.	**Lote No de $(Hib)_4$ tiolado**	**-SH/$(OS)_4$ (mol/mol)**	**% de recuperación de $(Hib)_4$ (Escala de Reacción)**
1	**HTM001**	**0.92**	**70 (5mg)**
2	**HTM002**	**0.72**	**65 (8.5mg)**
3	**HTM003**	**0.70**	**76 (15mg)**
4	**HTM004**	**0.54**	**83(18.5m g)**
5	**HTM005**	**0.64**	**89 (18mg)**
6	**HTM006**	**0.83**	**80(10 mg)**
7	**HTM007**	**0.81**	**80 (10 mg)**

El proceso de activación del oligómero resulta en oligosacáridos sintéticos activados con enlazador terminal de amina. Fig. 1 colectivamente como la Fig. Ia, Ib, Ic, Id, le representa diferentes serogrous meningocócica sintético con enlazador de amina terminal utilizado para la preparación de diferentes conjugados oligoméricos de proteínas por conjugación química de tioéter.

Ejemplo 2: La activación y el análisis de TT para generar el grupo funcional maleimida reactiva

El toxoide tetánico (TT) ha sido tomado a una concentración de 20 mg / ml, (0.133mMolar) en tampón HEPES 0,1 M, a pH 7,6 y se hace reaccionar con 7,2 mg de N- beta-Maleimidopropiloxi) succinimida éster (BMPs) (27 mMolar) en l-metil-2-pirrolidinona. Después de 2 horas de mezcla a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se ha lavado

6-7 veces con tampón de PBS 0,1 M que contiene NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, a pH 6,8 a través de filtros centrífugos de corte50 kD. El TT Activado se ha recogido en un volumen de 0,5 ml en tampón de PBS 0,1 M que contiene NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, a pH 6,8 y se utiliza posteriormente para la conjugación en el ejemplo 4. El diagrama esquemático para el proceso de activación de TT se muestra en la Fig. 2b.

La proteína activada se analizó para conocer el contenido de proteína y contenido de maleimida. El contenido de proteína del TT activado se ha determinado por el método de Lowry utilizando BSA como estándar; y el contenido de maleimida se ha estimado indirectamente mediante el ensayo de Ellman, donde el TT etiquetado con maleimida ha sido el primero en hacrse reaccionar con una cantidad conocida de p-mercaptoetanol y el (3-mercaptoetanol sin reaccionar ha sido analizado por DTNB. El número de maleimidas por molécula de TT se calcula por la concentración Molar de TT y maleimida. Los datos para el análisis del TT activado se dan en la Tabla 5.

Tabla 5: activación de la proteína (toxoide tetánico) para generar un grupo maleimida reactivo.

Lote no. TT etiquetado con maleimida	**Maleimida/TT (mol/mol)**	**% de recuperación de (Escala de Reacción)**
Lote 1	**38**	74(10 mg)
Lote 2	**41**	**95 (20 mg)**
Lote 3	**35**	**98 (20 mg)**
Lote 4	**38**	**91 (20 mg)**
Lote 5	**35**	**88 (20 mg)**
Lote 6	**39**	**80 (20 mg)**
Lote 7	**35**	**80 (20 mg)**
Lote 8	**32**	**80 (20 mg)**

Ejemplo 3: La activación de CRM197 para generar el grupo funcional maleimida reactivo

CRM197 se ha tomado a una concentración de 25 mg (0.24mMolar) en 1,8 ml de 0,1 M de tampón HEPES, a pH 7,6 y se hace reaccionar con 2,6 mg de N-(beta- Maleimidopropiloxi) succinimida éster (BMPs) (3,7 mMolar) en 1-metil-2-pirrolidinona. Después de 2 horas de

mezcla a temperatura ambiente, la mezcla de reacción 15 se ha lavado 6-7 veces con tampón de PBS 0,1 M que contiene NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, a pH 6,8 a través de filtros centrífugos de 10 kD de corte. La proteína activada que se ha recogido en un volumen de 0,5 ml en tampón de PBS 0,1 M que contiene NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, a pH 6,8 y se ha utilizado posteriormente para la conjugación. La proteína activada ha sido probada para conocer el contenido de proteína total por el método de Lowry y para el contenido de maleimida por el ensayo de Elman para determinar los grupos maleimida por molécula de CRM. Los datos para el análisis de CRM 197 activada se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6: activación de CRM197 para generar grupo maleimida reactivo.

Lote no. CRM etiquetado con maleimida	Maleimida/ CRM (mol/mol)	% de recuperación de (Escala de Reacción)
CRM-001 M	**10**	**59 (2.7 mg)**
CRM-002M	**20**	**32 (24mg)**
CRM-003M	**14**	**53 (9mg)**
CRM-004 M	**10**	**56 (9mg)**
CRM-005M	**17**	**42 (10mg)**
CRM-006M	**15**	**61 (11 mg)**

Ejemplo 4: Conjugación del oligómero activado (Hib, MenA, MenC, MenY, MenW y MENX) con la proteína activada (TT o CRM) a través de un enlace tioéter

El oligómero tiolado del ejemplo 1 en tampón de HEPES 0,1 M que contiene, NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, a pH 7,5, a una concentración de 10 mg / ml se ha mezclado con la recién preparada ~ 10 mg / ml de TT o CRM marcado con maleimida en PBS0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA5 mM, a pH 6,8. La mezcla de reacción a un pH de 6.5 a 7.5 (preferiblemente 7,0) se ha mantenido en agitación suave durante toda la noche, preferiblemente a 2-8 °C, la agitación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente también. El conjugado crudo se ha purificado mediante el lavado 6-7 veces con tampón de MES 0,05 M que contiene NaCl 0,2 M a pH 6,5 a través de los filtros centrífugos de 50 kD de corte para eliminar los oligómeros no conjugados e impurezas como clorhidrato de hidroxilamina sin reaccionar. Los conjugados finales purificados se han filtrado a través de

filtros de 0,2 g y se almacenan a 2-8 °C hasta su uso. El diagrama esquemático de la conjugación se muestra en la figura 2 (2c).

Ejemplo 5: Análisis fisicoquímico del oligómero conjugados MenC 20 obtenido en el ejemplo 4

Los conjugados $[MenC]_4$ y $[MenC]_8$ se han probado para conocer el contenido de proteína mediante el ensayo de Lowry usando 0,25 mg / ml de BSA como estándar y el contenido de oligómeros por el ensayo de ácido siálico usando 0,5 mg / ml de ácido N-acetil neuramínico (NANA) como estándar. La proporción de proteína de los oligosacáridos se ha calculado matemáticamente mediante base p/p. La cantidad de OS libre ha sido evaluada después de la precipitación con desoxicolato de sodio. A 900 µl de muestra de conjugado (aproximadamente 100 g de contenido OS), 80 µl de solución acuosa desoxicolato de sodio 1% p/v, pH 6,8 ± 0,2 se ha agregado. La mezcla de reacción 5 se ha mantenido a 2-8 °C durante 30 minutos, se han añadido 50 µl de HCl 1 N, y la muestra se ha centrifugado a 6000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se recogió y el contenido de sacárido libre fue estimado por el ensayo de resorcinol (Tabla 7, 8, 9). El perfil de los picos HPSEC de los conjugados se han comparado con el perfil de pico HPSEC del pico de proteína, en el detector UV para confirmar la conversión de toda la proteína a un conjugado en un PWXL TSKgel 4000 (7,8 X 300 mm, tamaño de partícula 7 m, TOSOH) y TSKgel 3000 PWXL (7,8 X 300 mm, tamaño de partícula 7 m, TOSOH) en serie con columna de protección TSKgel PWXL (6,0 X 40 mm, TOSOH). La fase móvil es NaNOs 0,1 M, a pH 7,2, a un caudal de 1,0 ml/min en el modo isocrático durante 30 min. El volumen de columna vacío total se ha determinado con dextrano, PM 50, 00,000-400, 00.000 (HI-MEDIA) y el óxido de deuterio (D_2O, Merck), respectivamente. Los picos de las proteínas y conjugados que se han detectado a 280 nm se muestran en la Fig. 3a y 3b. Los datos de caracterización de varios lotes de conjugados $(MenC)_4$-TT, conjugados $(MenC)_8$-TT, conjugados $(MenC)_4$ & $_8$-CRM se proporcionan en la Tabla 7, 8 y 9.

Tabla 7. Caracterización de varios lotes de conjugados $(MenC)_4$-TT

Lote No. Conjugado $(MenC)_4$-TT	Mezcla de Reacción		Proporción OS/TT (p/p)	OS Libre en el conjugado purificado (%)	Rendimiento del conjugado OS (%)
	$(MenC)_4$ tiolado (mg)	TT marcado con maleimida (mg)			
CTM-TT001	18	2.0	0.24	<2.0	20
CTM-TT002	4.3	4.0	0.25	<2.0	21
CTM-TT003	2.8	5	0.25	<2.0	32
CTM-TT004	4.2	8.2	0.28	<2.0	47
CTM-TT005	2.0	3.5	0.23	<2.0	38
CTM-TT006	3.8	12.8	0.28	5.9	39
CTM-TT007	3.1	11	0.20	<2.0	39
CTM-TT008	2.9	8	0.25	9.9	35
CTM-TT009	5.5	12	0.22	<2.0	34
CTM-TT010	6.0	8	0.23	<2.0	24
CTM-TT011	22.7	20	0.26	<2.0	22
CTM-TT012	20.8	15	0.31	2.2	20

Tabla 8. Caracterización de varios lotes de conjugados $(MenC)_8$-TT

Lote No. Conjugado $(MenC)_8$-TT	Mezcla de Reacción		Proporción OS/TT (p/p)	OS Libre en el conjugado purificado (%)	Rendimiento del conjugado OS (%)
	$(MenC)_8$ tiolado (mg)	TT marcado con maleimida (mg)			
COM-TT001	6.67	10	0.22	<2.0	33
COM-TT002	5	5	0.30	<2.0	28
COM-TT003	3	6.1	0.21	<2.0	31
COM-TT004	3	4	0.28	<2.0	29
COM-TT005	5.78	5.8	0.29	<2.0	21
COM-TT006	10.8	5.0	0.45	<2.0	28
COM-TT007	10	9.0	0.33	<2.0	28
COM-TT008	6.9	7.4	0.34	<2.0	37
COM-TT009	6.3	3.2	0.30	<2.0	21
COM-TT010	5.9	3.6	0.37	<2.0	22
COM-TT011	16.6	16	0.42	2%	25
COM-TT012	7.3	7.5	0.41	<2.0	40

Tabla 9: Caracterización de varios lotes de conjugados $(MenC)_{4\ \&\ 8}$-CRM

(MenC)- CRM Conjugado	Mezcla de reacción		OS/TT (p/p)	OS Libre en el conjugado purificado (%)	Rendimiento del conjugado OS (%)
	(MenC) tiolado (mg)	CRM marcado con maleimida (mg)			
$(MenC)_4$-CRM	6.8	6.7	0.26	<2.0	25
$(MenC)_8$-CRM	8.0	4.8	0.36	<2.0	20

Ejemplo 6: Análisis fisicoquímico de los conjugados de Hib obtenidos a partir del Ejemplo 4

El contenido de proteína del conjugado purificado se ha determinado mediante el ensayo de Lowry usando BSA 0,25 mg / ml como estándar, el contenido total de Hib mediante el ensayo de orcinol usando D-ribosa 0,2 molar como estándar y la relación de Hib a la proteína se ha calculado matemáticamente. El contenido de oligosacáridos libres se ha determinado en el sobrenadante después de la precipitación con desoxicolato 1% (DOC) como se hizo en el ejemplo anterior. Los datos de caracterización de varios lotes de conjugados $(Hib)_4$-TT se proporcionan en la Tabla 10. Los conjugados $(Hib)_4$-TT han sido analizados por HP-SEC, en comparación con TT modificado utilizado para la conjugación como se hizo en el ejemplo anterior para confirmar la conclusión de la conversión de una proteína (TT o CRM) a un conjugado se muestra en la Fig. 3c.

Tabla 10. Caracterización de varios lotes de conjugados $(Hib)_4$-TT

Conjugado $(Hib)_4$- TT	**Mezcla de Reacción**		**Proporción Hib/Proteína (p/p)**	**Hib Libre en el conjugado purificado (%)**	**Rendimiento en el Conjugado PRP (%)**
	$(Hib)_4$ Tiolado (mg)	TT marcado con maleimida (mg)			
Lote 1	1.5	3.2	0.30	6.6	55
Lote 2	1.6	2.4	0.46	5.2	47
Lote 3	2.0	6.0	0.17	6.7	49
Lote 4	3.4	5.0	0.42	6.6	62
Lote 5	4.0	8.0	0.31	4.3	63
Lote 6	8.6	12.9	0.35	5.4	66
Lote 7	8.0	14.0	0.35	2.9	59

Ejemplo 7: análisis fisicoquímico de los conjugados MenX obtenidos a partir del Ejemplo 4

Los conjugados $[MenX]_4$ se han probado para conocer el contenido de oligómeros por el ensayo de Chen para el fósforo utilizando una solución de fósforo 0,2 m Molar como un estándar y el contenido de proteína mediante el ensayo de Lowry. La relación de proteína - oligosacárido se ha calculado matemáticamente mediante base p/p. La cantidad de oligosacárido libre ha sido estimado porl ensayo de Resorcinol dado en la Tabla 11. Los conjugados $[MenX]_4$ han sido analizados por HPSEC para confirmar la completa de conversión de proteína de portadora modificada en el conjugado MenX. El perfil de los picos de HPSEC de los conjugados se muestra en la Fig. 3d.

Tabla 11: Caracterización de varios lotes de conjugados $(MenX)_4$-TT

Lote No. Conjugado $(MenX)_4$-TT	Mezcla de reacción		Proporción OS/TT (w/w)	OS Libre en el conjugado purificado (%)	Rendimiento en el Conjugado OS (%)
	$(MenX)_4$ Tiolado (mg)	TT marcado con maleimida (mg)			
βXTM-TT001	3.5	5.2	0.23	2.6	28
βXTM-TT002	5.5	8	0.24	<2	35
αXTM-TTOOl	**11.4**	13.5	0.32	<2	42
αXTM-TT002	15.4	15.2	0.31	<2	22
αXTM-TT003	16.1	13	0.32	<2	28

Ejemplo 8: Análisis fisicoquímico de los conjugados MenY obtenidos a partir del Ejemplo 4

Los conjugados $[MenY]_4$ ha sido probados para conocer el contenido de oligómeros por el ensayo de ácido siálico usando 0,5 mg / ml de ácido N-acetil neuramínico (NANA) como estándar y para conocer el contenido de proteína mediante el ensayo de Lowry. La proporción de proteína de los oligosacáridos se ha calculado matemáticamente mediante base p/p. La cantidad de oligosacárido libre ha sido estimado por el ensayo de Resorcinol proporcionado en la Tabla 12. Los conjugados $[MenY]_4$ han sido analizados por HPSEC para confirmar la conversión completa de la proteína de portadora modificada al conjugado $[MenY]_4$.

Tabla 12: Caracterización de los diferentes lotes de conjugados $(MenY)_4$-TT

Lote No. Conjugado $(MenY)_4$-TT	Mezcla de reacción		Proporción OS/TT (w/w)	OS Libre en el conjugado purificado (%)	Rendimiento en el Conjugado OS (%)
	$(MenY)_4$ Tiolado (mg)	TT marcado con maleimida (mg)			
YTM-TT001	5.3	7.5	0.34	<2	46
YTM-TT002	12	17	0.31	<2	41
YTM-TT003	**11.8**	15	0.40	<2	48

Ejemplo 9: análisis fisicoquímico de los conjugados MenW135 obtenidos a partir del Ejemplo 4

Los conjugados $[MenW]_4$ han sido probado para conocer el contenido de oligómeros por el ensayo de ácido siálico usando 0,5 mg / ml de ácido N-acetil neuramínico (NANA) como estándar y para el contenido de proteína mediante el ensayo de Lowry. La proporción de proteína de oligosacáridos se ha calculado matemáticamente mediante una base p/p. La cantidad de oligosacárido libre ha sido estimada por el ensayo de Resorcinol proporcionado en la Tabla 13. Los conjugados $[MenW]_4$ han sido analizados por HPSEC para confirmar la completa de conversión de la proteína de soporte modificada en los conjugados $[MenW]_4$.

Tabla 13: Caracterización de varios lotes de conjugados $(MenW)_4$-TT

Lote No. Conjugado $(MenW_{135})_4$-TT	**Mezcla de reacción**		**Proporción OS/TT (w/w)**	**OS Libre en el conjugado purificado (%)**	**Rendimiento en el Conjugado OS (%)**
	$(Men\ W_{135})_4$ tiolado (mg)	TT marcado con maleimida (mg)			
WTM-TT001	4.15	**6.25**	**0.25**	<2	**32**
WTM-TT002	10	**13**	**0.29**	<2	**37**
WTM-TT003	18.4	**24**	**0.23**	<2	**27**

Ejemplo 10: Determinación de las propiedades antigénicas de conjugado sintético MenX-TT.

La antigenicidad del conjugado sintético MenX tetrámero-TT se ha comparado con tetrámero MenX y un control no-antígeno en un ensayo inmunoenzimático de competencia ligado a enzimas (ELISA). En este ensayo, antisuero de conejo ocho mil veces diluido contra serogrupo X Neisseria meningitidis (228.801; BD) se ha incubado durante 1 hora a 37 °C con diferentes antígenos (conjugado sintético tetrámero-TT MenX y tetrámero MenX sintético) a diferentes concentraciones (10 , 50, 100, 200, 400, 1000 25 mg / ml) diluido en solución salina tamponada con fosfato que contiene 0,1% v/v de Brij 35 y 5% de FBS; en placas de micro titulación de 96 pozos (placa A). Una placa separada (placa B) se ha recubierto con una mezcla de polisacárido bacteriano y metilado MenX - albúmina sérica humana (HSA-m) y, posteriormente, se bloquearon con 5% de SFB después de la

incubación durante la noche a 2 °C y 8 °C. Para esta placa B, se ha añadido mezcla antitoxina-antígeno de la placa A y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 1 hora a temperatura ambiente. La placa ha sido lavada con solución salina tamponada con fosfato, a pH 7,4 que contiene 0,1% de Brij 35. La placa se ha incubado durante 60 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos anti- IgG de conejo marcado con peroxidasa en PBS, 0,1% de Brij 35 y 5% de FBS. La placa se ha lavado de nuevo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 100 µl del sustrato de peroxidasa, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina-H_20_2 en tampón de acetato de sodio. La reacción se ha detenido mediante la adición de 50 µl de H_2SO_4 2 M. La absorbancia (A450) se grabó en un lector de micro placa de ELISA). Los resultados se han trazado como gráfica de inhibición (%) v/s concentración (pg / ml) y se muestran en la Fig 4.

Ejemplo 11 Inmunización de ratones con los conjugados de oligómeros MenC

Los grupos de 8 ratones BALB/c hembra (5-8 semanas de edad) han sido inmunizados en los días 0, 14 y 28 con 1 mg de conjugados oligoméricos MenC. Todas las vacunas se han realizado mediante la administración de 200 µl de dilución de vacuna por vía subcutánea. La solución salina normal solo se ha usado para el grupo de control (vehículo) negativo, y una vacuna con licencia multivalente que contiene conjugado de polisacárido bacteriano MenC se ha utilizado para la inmunización de grupo de control positivo. Los sueros se han recogido en los días 14, 28 y 35. Los títulos de anticuerpos específicos anti-IgG OS se han estimado mediante ELISA indirecto. Los animales han sido dosificados con diferentes conjugados sintéticos MenC según la Tabla 14.

Tabla 14: diferentes formulaciones de conjugados $(MenC)_4$ para estudiar la inmunogenicidad en modelo de ratón

Sr. No.	Tipo de Antígeno	Dosis
Formulación FI	Negativo/Vehículo Control	**1µg**
Formulación F2	Vacuna aprobada equivalente a 1 ug de conjugado MenC conjugado (Control Positivo)	**1µg**
Formulación F3	Conjugado $(MenC)_4$-TT	**1µg**
Formulación F4	Conjugado $(MenC)_8$-CRM	**1µg**
Formulación F5	Conjugado $(MenC)_8$-TT	**1µg**
Formulación F6	Conjugado $(MenC)_8$-CRM	**1µg**

Ejemplo 12: Determinación de las propiedades antigénicas de conjugados sintéticos MenC-TT & conjugados sintéticos MenC-CRM mediante ELISA de IgG

Placas de 96 pozos (Nunc Maxisorp) se han recubierto con MenC PS mediante la adición de 100 µl por pozo de una mezcla de PS 5 mg / ml y m-HSA en tampón PBS, pH 7,4. Las placas se han incubado durante la noche a 4 °C, y después se lavaron tres veces con tampón de PBS (0,1% Brij 35 en PBS, pH 7,4) y se bloquearon con 200 µl de solución de FBS 5% en tampón de PBS (0,1% de Brij 35 en PBS, pH 7,4) por pozo durante 1 hora a 37 °C. Cada etapa de incubación ha sido seguida por tres lavados con tampón de PBS. Las muestras de referencia y los sueros de prueba se han diluido en tampón de PBS (0,1% de Brij 35, 5% de FBS en PBS, pH 7,4), se transfirió a placas bloqueadas revestidas con (200 µl), y diluidas en serie doble seguida de incubación durante la noche a 4 °C. Entonces 100 µl por pozo de 1:1000 conjugado anti-IgG de ratón diluido con peroxidasa se han añadido y se dejó durante 1 hora a 25 °C. 100 µl por pocillo de sustrato, 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina-H_20_2 ha sido añadido para el desarrollo de color. Después de 10 minutos de desarrollo a 25 °C, la reacción se ha detenido mediante la adición de 50 µl de H_2SO_4 2 M, y se ha medido la densidad óptica a 450 nm en lector de placas de Micro. La concentraciones de polisacáridos Anti-MenC de IgG (en términos de Unidades ELISA / ml) para cada formulación se han evaluado utilizando el software Combistat y las concentraciones medias geométricas (IgG GMC) se han mostrado en la Figura 5a.

Ejemplo 13: Ensayo Bactericida del Suero (SBA) para los conjugados sintéticos $(MenC)_4$-TT y conjugados $(MenC)_8$-TT

La cepa bacteriana C de *N. meningitidis* (ATCC® 13102 ™) ha sido cultivada durante la noche en 5 placas de agar de sangre de ovejas a 37 °C con 5% de CO_2. Las colonias aisladas se han recogido y se incubaron durante 4 h en la superficie de otra placa de agar de sangre de oveja a 37 °C con 5% de CO_2. Uno o dos asas de siembra de bacterias se han suspendido en 5 ml de tampón de ensayo (5% de albúmina de suero bovino en solución salina equilibrada de Hank sin calcio y magnesio), y la densidad óptica (DO_{650}) de la suspensión se ha ajustado a 0,1 que ha sido además diluido con tampón de ensayo hasta alcanzar la dilución de trabajo de 6 a 10 x 10^4 unidades formadoras de colonias por ml. Las muestras de control de calidad (QC) de suero y sueros de la prueba han sido inactivadas por

calor durante 30 minutos a 56 °C. En la placa de micro pozo, 20 µl de diluciones dobles de suero problema se ha mezclado con 10 µl de bacterias en la dilución de trabajo y 10 µl de complemento de cría de conejo (Pel-Freez). Para los controles negativos, las bacterias se han incubado, en un pozo separado, con el complemento de cría de conejo y sin el suero de ensayo y con el suero problema y el complemento de cría de conejo se ha inactivado por calor. Los contenidos han sido mezclados golpeando suavemente la placa de ensayo y se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C con 5% de CO_2. Diez muestras de µl de cada pozo en placas se han sembrado en placas de agar de sangre mediante un método de placas consecutivas. Las placas de agar de sangre se han incubado durante la noche a 37 °C con 5% de CO_2 y las colonias se han contado. La dilución más alta de suero que muestra disminución > 50% en unidades formadoras de colonias por ml después de la incubación de las bacterias con la mezcla de reacción, en comparación con el control respectivo complemento activo se considera como el título de SBA.

Se han considerado seis estudios diferentes para evaluar los títulos de SBA para los tetrámero MenC en comparación con la vacuna con licencia y resultados se representan en la figura 5b. Tres estudios han tenido en cuenta para la evaluación del título de SBA en octámero Men C y los resultados se representan en Fig.5c.

El ensayo inmunológico y bactericida en suero revela que los conjugados OS-PR de la presente invención dan como resultado títulos de anticuerpos IgG totales más altos. Los conjugados OS-PR después de 3 dosis a lµg mostraron dosis más de 4 veces mayor y títulos de IgG hasta 18 veces más altos que los títulos anteriores a la inmunización para el conjugado de oligosacáridos de la meningitis C. Los títulos de IgG totales son comparables o superiores a los títulos de la vacuna con licencia para MenC.

Los títulos de anticuerpos funcionales (también referidos como los títulos de SBA) son siempre más de 4 veces mayores que los títulos de SBA de pre-inmunización para conjugados de proteína MenC y son comparables o superiores a los títulos de la vacuna con licencia.

Ejemplo 14 Inmunización de ratones con (MENX) conjugado 4-TT y la determinación de IgG por ELISA.

Los grupos de 8ratones BALB / c hembra (5-8 semanas de edad) han sido inmunizados en los días 0, 14 y 28 con 1 y 0,1 µg (200PL) de conjugado $(MenX)_4$-TT formulado en una solución salina normal por vía subcutánea. La solución salina normal solo se ha usado para el grupo control negativo. Los sueros han sido recogidos en los días 14, 28 y 35. Como no hay ninguna vacuna comercial disponible para el grupo MenX, los títulos se han comparado con el control negativo. El estudio incluyó dos dosis diferentes (1 y 0,1 mg) y la evaluación de dos lotes diferentes de 25 αXTM-TT y una gran cantidad de conjugado βXTM-TT. Se tomaron diferentes formulaciones conjugadas de $(MenX)_4$ para estudiar su inmunogenicidad en modelo de ratón como en la figura 5d.

Los títulos de anticuerpos específicos anti-IgG OS se han estimado mediante ELISA. Placas de 96 pozos (Nunc Maxisorp) se han recubierto con MenX PS bacteriana mediante la adición de 100 µl por pozo de una mezcla de PS 5 pg/ml y m-HSA en tampón PBS, pH 7,4. Las placas se han incubado durante la noche a 4 °C, y después se lavaron tres veces con tampón de PBS (0,1% Brij 35 en PBS, pH 7,4) y se bloquearon con 200 µl por pozo de solución de FBS 5% en tampón de PBS (0,1% de Brij 35 en PBS, pH 7,4) durante 1 hora a 37 °C. Cada etapa de incubación ha sido seguida por tres lavados con tampón de PBS. Todas las muestras de suero se han diluido en tampón de PBS (0,1% de Brij 35, 5% de FBS en PBS, pH 7,4), se transfirió a placas de bloqueo recubiertas (200 ul), y diluido en serie seguido de incubación durante la noche a 4 °C. A continuación, se añadieron 100 µl por pozo de conjugado diluidos con peroxidasa anti-IgG de ratón 1: 1000 y se dejaron durante 1 hora a 25 °C. se añadió tetrametilbencidina-H_20_2 para el desarrollo del color - 100 µl por pozo de sustrato, 3,3', 5,5'. Después de 10 minutos de desarrollo a 25 °C, la reacción se ha detenido mediante la adición de 50 µl de H_2SO_4 2 M, y la DO se ha medido a 450 nm en lector de placas de Micro. Las GMC de IgG para cada formulación se ha evaluado mediante el uso de software Combistat como se muestra en la figura 5d.

Ejemplo 15: Ensayo Bactericida del Suero (SBA) para los conjugados sintéticos $(MenX)_4$-TT

La cepa bacteriana X de *N. meningitidis*serogrupo (ATCC® 35560) ha crecido durante la noche en placas de agar de sangre de ovejas a 37 °C con 5% de CO_2. Las colonias aisladas se han recogido y se incubaron durante 4 h en la superficie de otra placa de agar de sangre de oveja a 37 °C con 5% de CO_2. Una o dos asa de siembra con bacterias se han suspendido en 5 ml de tampón de ensayo (5% de albúmina de suero bovino en solución salina equilibrada de Hank con calcio y magnesio), y la densidad óptica (DO_{650}) de la suspensión se ha ajustado a 0,1 que ha sido además diluido con tampón de ensayo a la dilución de trabajo de 6 a 10 x 10^4 unidades formadoras de colonias por ml. Las muestras de control de calidad (QC) de suero y sueros de la prueba han sido inactivadas por calor durante 30 minutos a 56 °C. En la placa de micro pozo, 20 µl de diluciones dobles de suero de ensayo mezclado con 10 µl de bacterias en la dilución de trabajo y 10 µl de complemento de conejo bebé (pellets Freez). Para los controles negativos se han incubado bacterias, en un pozo separado, con el complemento de cría de conejo y sin el suero de ensayo y con el suero problema y el complemento de cría de conejo inactivado por calor. Los contenidos han sido así mezclados golpeando suavemente la placa de ensayo y se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C con 5% de CO_2. Diez muestras de ul de cada pozo en placas sobre placas de agar de sangre mediante un método de placa consecutivas. Las placas de agar de sangre se han incubado durante la noche a 37 °C con 5% de CO_2 y las colonias se han contado. La dilución más alta de suero que muestra disminución > 50% en unidades formadoras de colonias por ml después de la incubación de las bacterias con la mezcla de reacción, en comparación con el control respectivo complemento activo se considera como el título de SBA.

Tres conjugados MenX diferentes han sido evaluados en contra del sueros de control negativo (vehículo) y el tetrámero MenX no conjugado y los resultados se presentan como en la figura 5d. Los títulos totales de IgG e SBA para conjugados 20 MenX-TT son al menos 4 veces mayor que el control negativo (vehículo) y son hasta 45 veces más alta en términos de IgG total y hasta 350 veces más altos que los títulos de SBA que el control negativo (vehículo).