



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 670**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/385** (2006.01)  
**A61K 39/116** (2006.01)  
**A61K 39/095** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05850768 .2**  
96 Fecha de presentación : **23.12.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1838345**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **Vacunas de conjugados de sacáridos.**

30 Prioridad: **24.12.2004 GB 0428394**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.04.2011**

73 Titular/es:  
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.**  
**Via Fiorentina 1**  
**53100 Siena, SI, IT**

72 Inventor/es: **Del Giudice, Giuseppe y**  
**Baraldo, Karin**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 670 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención está en el campo de las vacunas y se refiere a nuevas composiciones que comprenden dos o más antígenos de sacárido conjugados con una proteína portadora de poliepítopos que comprende epítopos de linfocitos T de múltiples proteínas patogénicas. La invención también se refiere a procedimientos para preparar dichas composiciones y a usos para dichas composiciones.

## TÉCNICA ANTERIOR

10 En la técnica se conocen vacunas polivalentes. Un ejemplo tal es una vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y y W135 de *N. meningitidis* que se conoce desde hace muchos años [1, 2] y se ha autorizado para uso humano. Sin embargo, aunque son eficaces en adolescentes y adultos, induce una pobre respuesta inmunitaria y corta duración de la protección y no pueden usarse en bebés [por ejemplo, 3]. Esto es debido a que los polisacáridos son antígenos independientes de linfocitos T que generalmente inducen una débil respuesta inmunitaria que no puede reforzarse. Frecuentemente han surgido con respecto al uso generalizado de vacunas polivalentes debido a que están sometidas a una significativa disminución en la inmunofunción conocida como inmunosupresión. La inmunosupresión puede producirse cuando la cantidad de antígeno introducida en el sujeto supere la capacidad del sistema inmunitario para responder. Una condición tal se llama sobrecarga de antígeno. La inmunosupresión también puede producirse como resultado de un componente de antígeno que previene al sistema inmunitario de responder a otro componente de antígeno de una vacuna polivalente. Esta última forma de inmunosupresión se llama interferencia de vacunas.

20 En los últimos 20 años se han desarrollado vacunas conjugadas que comprenden polisacáridos capsulares bacterianos conjugados con portadores de proteína. Ejemplos incluyen la vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) [4], además de vacunas conjugadas contra *Streptococcus pneumoniae* [5] y el serogrupo C de *Neisseria meningitidis* (MenC) [6].

25 Las proteínas portadoras usadas en vacunas autorizadas incluyen toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), el mutante CRM197 no tóxico de la toxina de la difteria y el complejo de la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* grupo B. Como están introduciéndose más vacunas conjugadas en la práctica médica, los bebés podrían recibir múltiples inyecciones de la proteína portadora tanto como una propia vacuna (por ejemplo, TT o DT) o como una proteína portadora presente en una vacuna conjugada. Como estas proteínas son altamente inmunogénicas tanto al nivel de linfocitos B como T, la sobrecarga de portador puede inducir inmunosupresión en individuos sensibilizados [7]. Se cree que este fenómeno, llamado la supresión epitópica inducida por portador, es debido a anticuerpos específicos para portador y a competición antigénica intramolecular [8]. Idealmente, una proteína portadora deberá inducir un fuerte efecto auxiliar para un epítipo de linfocitos B conjugado (por ejemplo, polisacárido) sin inducir una respuesta de anticuerpos contra sí mismo. El uso de epítopos universales que son inmunogénicos en el contexto de la mayoría de las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad es un enfoque hacia este objetivo [9]. Tales epítopos se han identificado dentro de TT y otras proteínas. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de otras mejoras.

Por tanto, es objeto de la invención proporcionar conjugados de sacáridos mejorados.

## 40 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se ha descubierto que proteínas portadoras de poliepítopos son particularmente útiles como portadores para combinaciones de sacáridos. Además, se ha descubierto que sólo se observa una baja respuesta inmunogénica contra estas proteínas portadoras aún cuando comprenden varios epítopos patogénicos conocidos, mientras que se habría esperado que la respuesta inmunogénica aumentara proporcionalmente al número de epítopos patogénicos.

45 Por tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una combinación de dos o más conjugados monovalentes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más. Véase la Figura 1A). Cada conjugado monovalente comprende (i) proteína portadora N19 conjugada con (ii) un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W, o Y de *N. meningitidis*. Preferentemente, la proteína portadora usada en cada conjugado es la misma.

50 Aunque cada molécula de proteína portadora en cada conjugado monovalente puede conjugarse con más de una molécula de antígeno de sacárido (por ejemplo, 1, 5, 10, 20 o más), debido a los múltiples sitios de unión en cada molécula de proteína portadora (Figura 1B), cada antígeno de sacárido conjugado con cualquier proteína portadora dada es preferentemente del mismo patógeno antigénicamente distinto. Por ejemplo, los antígenos de sacárido de MenA son diferentes de los de MenC, MenW y MenY y, por tanto, se dice que son de patógenos antigénicamente distintos, mientras que los antígenos de sacárido de Hib son todos del mismo patógeno antigénicamente distinto. En un único conjugado, los sacáridos individuales, aunque del mismo patógeno antigénicamente distinto, pueden ser de longitudes de cadena diferentes.

Como alternativa, en algunas realizaciones la invención proporciona un conjugado multivalente que comprende dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más) antígenos de sacárido antigénicamente distintos de los serogrupos A, C, W o Y de *N. meningitidis* conjugados con la proteína portadora N19 (Figura 1C). En este caso, los antígenos de sacárido son de patógenos antigénicamente distintos diferentes. Por tanto, por ejemplo, en una composición de conjugado tal, cada molécula de proteína portadora N19 puede tener antígenos de sacárido de dos o más de MenA, MenC, MenW, MenY conjugados con ella. La invención también proporciona una composición que comprende dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de estos conjugados multivalentes.

Como otra alternativa, la invención proporciona una composición que comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) conjugados monovalentes y uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) conjugados multivalentes como se han descrito anteriormente.

#### **Proteína portadora**

La proteína portadora es N19 (SEC ID NO: 11). Se ha mostrado que una proteína genéticamente manipulada llamada N19 [10], expresada en *Escherichia coli* y que tiene varios epítopes universales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos, se comporta como un portador fuerte cuando se conjuga con el polisacárido Hib [11], documento WO 99/55730A y Falusi, F. y col. (2001) Eur J. Immunol, 31(12) 3816-3824, y menc (Baraldo, K. y col. (2004) infect immun, 72(8) 4884-4887). La región del extremo N de N19 está constituida por (i) una cola de seis His que puede explotarse durante la purificación, (ii) una secuencia Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp de péptido flag (SEC ID NO: 12) reconocida por un anticuerpo policlonal de conejo que puede usarse para el cribado de colonias positivas durante el procedimiento de clonación, (iii) el sitio de reconocimiento del factor Xa Ile-Glu-Gly-Arg (SEC ID NO: 13) para la fácil eliminación de la marca. N19 es una duplicación de los nueve primeros epítopes enumerados en la Tabla 1 más el epítipo de CD4<sup>+</sup> de la matriz de la gripe MT. Los epítipes están separados por un espaciador Lys-Gly para proporcionar flexibilidad a la molécula y para permitir la posterior conjugación del polisacárido con los grupos ε-amino primarios de residuos de Lys.

Además de los epítipes de CD4<sup>+</sup>, las proteínas portadoras pueden comprender otros péptidos o fragmentos de proteína tales como epítipes de citocinas inmunomoduladoras tales como interleucina 2 (IL-2) o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

Tabla 1

Epítipo de linfocitos T	Origen	Posición de aa	Secuencia de aminoácidos (SEC ID NO)	Referencias
P23TT	Toxina tetánica	1084-1099	VSIDKFRIFCKANPK (1)	12
P32TT	Toxina tetánica	1174-1189	LKFIKRYTPNNEIDS (2)	12
P21TT	Toxina tetánica	1064-1079	IREDDNITLKLDRCNN (3)	13
PfCs	Proteína circunsporozoito de <i>P. falciparum</i>	380-398	EKKIAKMEKASSVFNVVN (4)	14
P30TT	Toxina tetánica	947-967	FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE	15
P2TT	Toxina tetánica	830-843	QYIKANSKFIGITE (6)	15,16
HBVnc	Nucleocápside del virus de la hepatitis B	50-69	PHHTALRQAILCWOELMTLA (7)	17
HA	Hemaglutinina del virus de la gripe	307-319	PKYVKQNTLKLAT(8)	16
HBsAg	Proteína de superficie del virus de la hepatitis B	19-33	FFLLTRILTIPQSLD (9)	18
MT	Proteína de matriz del virus de la gripe	17-31	YSGPLKAEIAQRLEDV (10)	19

**Antígenos de sacárido**

El antígeno de sacárido conjugado con la proteína portadora en una composición de la invención es un sacárido capsular bacteriano de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, C, W135 y/o Y),

La cápsula del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA) es un homopolímero de *N*-acetil-D-manosamina-1-fosfato ligado en ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6) con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. El sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC) es un homopolímero de ácido siálico ligado en ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 9) con O-acetilación variable en las posiciones 7 y/u 8. El sacárido del serogrupo W135 de *N. meningitidis* es un polímero que tiene unidades de ácido siálico-disacárido galactosa [ $\rightarrow$ 4]-D-Neup5Ac(7/90Ac)- $\alpha$ -(2-6)-D-Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ )]. Tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [24]. El sacárido del serogrupo Y de *N. meningitidis* es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición del disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa [ $\rightarrow$ 4]-D-Neup5Ac(7/90Ac)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Glc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ )]. También tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico.

Las composiciones de la invención comprenden mezclas de antígenos de sacárido. Preferentemente, las composiciones comprenden 2, 3, 4 o más antígenos de sacárido diferentes. Los antígenos pueden ser del mismo patógeno o de patógenos antigénicamente distintos. Las composiciones de la invención comprenden antígenos de sacárido de más de un serogrupo de *N. meningitidis*, por ejemplo, las composiciones pueden comprender sacáridos conjugados de los serogrupos A+C, A+W135, A+Y, C $\pm$ W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. Las composiciones preferidas comprenden sacáridos de los serogrupos C y Y. Otras composiciones preferidas comprenden sacáridos de los serogrupos C, W135 y Y. Particularmente, las composiciones preferidas comprenden sacáridos de los serogrupos A, C, W135 y Y.

Si una mezcla comprende sacáridos meningocócicos del serogrupo A y al menos otro sacárido de serogrupo, la relación (peso/peso) de sacárido MenA con respecto a cualquier otro sacárido de serogrupo puede ser superior a 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Se prefieren relaciones entre 1:2 y 5:1, ya que son relaciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Las relaciones preferidas (peso/peso) para sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2: 1: 1; 4:4:2: 1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2: 1.

La invención también proporciona, en algunas realizaciones, combinaciones de conjugados en los que la proteína portadora no es la misma para cada conjugado.

Otras composiciones preferidas de la invención comprenden un primer conjugado y un segundo conjugado. El primer conjugado comprende un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W, o Y de *N. meningitidis* conjugado con la proteína portadora N19; y el segundo conjugado comprende un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W o Y de *N. meningitidis* conjugado con una proteína portadora diferente de N19. Por ejemplo, el segundo conjugado puede ser un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* conjugado con el portador CRM197. El (Los) antígeno(s) de sacárido de *N. meningitidis* en el segundo conjugado pueden ser iguales a o diferentes del (de los) antígeno(s) de sacárido en el primer conjugado.

**Preparación de antígenos de sacárido capsulares**

Los procedimientos para la preparación de antígenos de sacárido capsulares son muy conocidos. Por ejemplo, la ref. 25 describe la preparación de antígenos de sacárido de *N. meningitidis*. Los sacáridos capsulares pueden purificarse por técnicas conocidas como se describen en varias referencias en este documento.

Los antígenos de sacárido pueden modificarse químicamente. Por ejemplo, pueden modificarse para sustituir uno o más grupos hidroxilo con grupos de bloqueo. Esto es particularmente útil para el serogrupo A meningocócico en el que los grupos acetilo pueden sustituirse con grupos de bloqueo para evitar la hidrólisis [29]. Tales sacáridos modificados todavía son sacáridos de serogrupo A dentro del significado de la presente invención.

El sacárido puede modificarse químicamente con respecto al sacárido capsular como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el sacárido puede ser des-O-acetilado (parcialmente o completamente), des-N-acetilado (parcialmente o completamente), N-propionado (parcialmente o completamente), etc. La des-acetilación puede producirse antes, durante o después de la conjugación, pero preferentemente se produce antes de la conjugación. Dependiendo del sacárido particular, la des-acetilación puede o puede no afectar la inmunogenicidad, por ejemplo, la vacuna NeisVac-C™ usa un sacárido des-O-acetilado, mientras que Menjugate™ está acetilado, pero ambas vacunas son eficaces. El efecto de la des-acetilación, etc., puede evaluarse mediante ensayos rutinarios

Los sacáridos capsulares pueden usarse en forma de oligosacáridos. Éstos se forman convenientemente por fragmentación de polisacárido capsular purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado. La fragmentación de polisacáridos se realiza preferentemente para dar un grado de polimerización (GP) promedio final en el

oligosacárido de menos de 30. El GP puede medirse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [30].

5 Si se realiza la hidrólisis, el hidrolizado se clasificará generalmente según el tamaño con el fin de eliminar oligosacáridos de longitud corta [31]. Esto puede lograrse en diversas formas tales como ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a o igual a aproximadamente 6 se eliminan preferentemente para meningococos de serogrupo A, y aquellos inferiores a aproximadamente 4 se eliminan preferentemente para los serogrupos W 135 y Y.

#### **Conjugados de portador-sacárido**

10 Los conjugados de la invención pueden incluir pequeñas cantidades de portador libre (es decir, sin conjugar). Cuando está presente una proteína portadora dada en tanto forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma sin conjugar es preferentemente no superior al 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferentemente está presente a menos del 2% (en peso).

15 Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay muchos procedimientos adecuados que incluye cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las refs. 32 y 33, etc.].

20 Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado si es necesario. La unión del antígeno de sacárido al portador es preferentemente mediante un grupo  $-NH_2$ , por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de lisina en una proteína portadora, o de un residuo de arginina. Si un sacárido tiene un grupo aldehído libre, entonces éste puede reaccionar con una amina en el portador para formar un conjugado mediante aminación reductora. La unión también puede ser mediante un grupo  $-SH$ , por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de cisteína. Alternativamente, el antígeno de sacárido puede unirse al portador mediante una molécula de ligador.

25 El sacárido se activará o funcionalizará normalmente antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianación tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio [34, 35, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norbornano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU (véase también la introducción a la referencia 36).

#### **Ligadores**

30 Los enlaces mediante un grupo ligador pueden hacerse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 37 y 38. Un tipo de enlace implica aminación reductora del sacárido, acoplamiento del grupo amino resultante a un extremo de un grupo ligador de ácido adípico, y luego acoplamiento de la proteína portadora al otro extremo del grupo ligador de ácido adípico [39, 40]. Otros ligadores incluyen B-propionamido [41], nitrofenil-etilamina [42], haluros de haloacilo [43], enlaces glucosídicos [44], ácido 6-aminocaproico [45], ADH [46], restos C4 a C12 [47], etc. Como alternativa a usar un ligador puede usarse un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido seguido de aminación reductora con la proteína como se describe en, por ejemplo, las referencias 48 y 49.

40 Se prefiere un procedimiento que implique la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, reemplazando los grupos  $=O$  terminales con  $-NH_2$ ), seguido de la derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimidodiéster de ácido adípico) y reacción con la proteína portadora.

Puede usarse un ligador bifuncional para proporcionar un primer grupo para el acoplamiento a un grupo amina en el sacárido y un segundo grupo para el acoplamiento al portador (normalmente para el acoplamiento a una amina en el portador).

45 Por tanto, el primer grupo en el ligador bifuncional puede reaccionar con un grupo amina ( $-NH_2$ ) en el sacárido. Esta reacción implicará normalmente una sustitución electrófila del hidrógeno de la amina. El segundo grupo en el ligador bifuncional puede reaccionar con un grupo amina en el portador. Esta reacción implicará normalmente de nuevo una sustitución electrófila de la amina.

50 Si las reacciones con tanto el sacárido como el portador implican aminas, entonces se prefiere usar un ligador bifuncional de fórmula X-L-X en la que: los dos grupos X son iguales entre sí y pueden reaccionar con las aminas; y en la que L es un resto de enlace en el ligador. Un grupo X preferido es N-oxisuccinimida. L tiene preferentemente la fórmula  $L'-L^2-L'$  en la que L' es carbonilo. Los grupos  $L^2$  preferidos son alquilo de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>), por ejemplo,  $-(CH_2)_4-$ .

55 Otros grupos X son aquellos que forman ésteres cuando se combinan con HO-L-OH tales como norbornano, ácido p-nitrobenzoico y sulfo-N-hidroxisuccinimida.

Otros ligadores bifuncionales para uso con la invención incluyen haluros de acrilóilo (por ejemplo, cloruro) y haluros de haloacilo.

El ligador se añadirá generalmente en exceso molar al sacárido modificado.

5 Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay muchos procedimientos adecuados que incluyen cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las refs. 50 y 51, etc.].

Si la composición de la invención incluye un sacárido despolimerizado, se prefiere que la despolimerización preceda a la conjugación.

### Otros antígenos

10 Las composiciones de la invención pueden comprender uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) otros antígenos, tales como:

#### A. Antígenos bacterianos

15 Antígenos bacterianos adecuados para uso en la invención incluyen proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y vesículas de la membrana externa que pueden aislarse, purificarse o derivarse de una bacteria. Además, los antígenos bacterianos pueden incluir lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivadas. Los antígenos bacterianos pueden producirse por expresión recombinante. Los antígenos bacterianos incluyen preferentemente epítopes que se exponen sobre la superficie de las bacterias durante al menos una fase de su ciclo vital. Los antígenos bacterianos se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias expuestas a continuación, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación.

20 *Neisseria meningitidis*: antígenos meningocócicos pueden incluir proteínas (tales como aquellas identificadas en las referencias 52-58), sacáridos (incluyendo un polisacárido, oligosacárido o lipopolisacárido), o vesículas de la membrana externa [59-62] purificadas o derivadas de un serogrupo de *N. meningitidis* tal como A, C, W135, Y, y/o B. Los antígenos de proteína meningocócica pueden seleccionarse de adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro y proteínas asociadas a la membrana (preferentemente proteínas integrales de membrana externa). Véanse también las refs. 63-71.

25 *Streptococcus pneumoniae*: los antígenos de *S. pneumoniae* pueden incluir un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y/o proteína de *S. pneumoniae*. Los antígenos de proteína pueden seleccionarse, por ejemplo, de una proteína identificada en cualquiera de las refs. 72-77. Las proteínas de *S. pneumoniae* pueden seleccionarse de la familia Poly Histidine Triad (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncados de CbpX-truncados de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 o Sp133. Véanse también las refs. 78-84.

30 *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A): los antígenos de *Streptococcus* del grupo A pueden incluir una proteína identificada en la referencia 85 u 86 (incluyendo GAS40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluyendo aquellas descritas en las refs. 87-89), proteína de unión a fibronectina (Sfb1), proteína asociada a hemo estreptocócico (Shp) y estreptolisina S (SagA). Véanse también las refs. 85, 90 y 91.

40 *Moraxella catarrhalis*: los antígenos de *Moraxella* incluyen antígenos identificados en las refs. 92 y 93, antígenos de proteína de membrana externa (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS. Véase también la ref. 94.

*Bordetella pertussis*: los antígenos de *Pertussis* incluyen holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3. Véanse también las refs. 95 y 96.

45 *Staphylococcus aureus*: los antígenos de *S. aureus* incluyen polisacáridos capsulares de tipo 5 y 8 de *S. aureus* opcionalmente conjugados con exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante no tóxica tal como StaphVAX™, o antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, cinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben la asfixia fagocítica (cápsula, proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factor de coagulación y/o toxinas que dañan la membrana (opcionalmente desintoxicadas) que lisan membranas de células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina). Véase también la ref. 97.

50 *Staphylococcus epidermidis*: los antígenos de *S. epidermidis* incluyen antígeno asociado a ceno (SAA).

55 *Clostridium tetani* (tétanos): los antígenos del tétanos incluyen toxoide tetánico (TT), usado preferentemente como una proteína portadora junto con/conjugada con las composiciones de la presente invención.

*Corynebacterium diphtheriae* (difteria): los antígenos de la difteria incluyen toxina diftérica o mutantes desintoxicados de la misma tales como CRM197. Otros antígenos que pueden modular, inhibir o asociar una ribosilación de ADP se contemplan para la combinación/coadministración/conjugación con las composiciones de la presente invención. Estos antígenos de la difteria pueden usarse como proteínas portadoras.

- 5 *Haemophilus influenzae*: los antígenos de *H. influenzae* incluyen un antígeno de sacárido de tipo B, o proteína D [98].
- Pseudomonas aeruginosa*: los antígenos de *Pseudomonas* incluyen endotoxina A, proteína Wzz y/o proteínas de membrana externa, que incluyen proteínas F de membrana externa (OprF) [99].
- Legionella pneumophila*: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Legionella pneumophila*.
- 10 *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B): los antígenos de *Streptococcus* del grupo B incluyen antígenos de proteína identificados en las refs. 85 y 100-103. Por ejemplo, los antígenos incluyen proteínas GBS80, GBS104, GBS276 y GBS322.
- 15 *Neisseria gonorrhoeae*: los antígenos gonocócicos incluyen proteína Por (o porina) tal como PorB [104], una proteína de unión a transferrina tal como TbpA y TbpB [105], una proteína de opacidad (tal como Opa), una proteína modificable por reducción (Rmp) y preparaciones de vesículas de la membrana externa (OMV) [106]. Véanse también las refs. 52-54 & 107.
- 20 *Chlamydia trachomatis*: los antígenos de *C. trachomatis* incluyen antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes de tracoma, una causa de ceguera), serotipos L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> (asociados a linfogranuloma venéreo) y serotipos, D-K. Los antígenos de *C. trachomatis* también pueden incluir un antígeno identificado en las refs. 103 y 108-110 que incluye PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), ADNK (CT396), CT398, similar a OmpH (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823) y MurG (CT761). Véase también la ref. 111.
- Treponema pallidum* (sífilis): los antígenos de la sífilis incluyen el antígeno TmpA.
- 25 *Haemophilus ducreyi* (que produce chancroide): los antígenos de *Ducreyi* incluyen proteína de membrana externa (DsrA).
- Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*: los antígenos incluyen una repetición de trisacáridos u otros antígenos derivados de *Enterococcus* proporcionados en la ref. 112.
- Helicobacter pylori*: los antígenos de *H. pylori* incluyen Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y/o antígeno de ureasa [113-123].
- 30 *Staphylococcus saprophyticus*: los antígenos incluyen la hemaglutinina de 160 kDa del antígeno de *S. saprophyticus*.
- Yersinia enterocolitica*: los antígenos incluyen LPS [124].
- 35 *Escherichia coli*: los antígenos de *E. coli* pueden derivarse de cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).
- Bacillus anthracis* (ántrax): los antígenos de *B. anthracis* están opcionalmente desintoxicados y puede seleccionarse de A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), ambos pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA). Véanse las refs. 125-127.
- 40 *Yersinia pestis* (plaga): los antígenos de plagas incluyen antígeno capsular F1 [128], LPS [129], antígeno V [130].
- Mycobacterium tuberculosis*: los antígenos de *Tuberculosis* incluyen lipoproteínas, LPS, antígenos BCG, una proteína de fusión de antígeno 85B (Ag85B) y/o ESAT-6 opcionalmente formulado en vesículas de lípido catiónico [131], antígenos asociados a isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) [132] y/o antígenos MPT51 [133].
- 45 *Rickettsia*: los antígenos incluyen proteínas de membrana externa que incluyen la proteína de membrana externa A y/o B (OmpB) [134], LPS y antígeno de proteína de superficie (SPA) [135].
- Listeria monocytogenes*: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Listeria monocytogenes*.
- Chlamydia pneumoniae*: los antígenos incluyen aquellos identificados en las refs. 108 y 136 a 141.
- 50 *Vibrio cholerae*: los antígenos incluyen antígenos de proteinasa, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O-específicos O1 Inaba, *V. cholera* O139, antígenos de la vacuna IEM108 [142] y/o toxina de *Zonula occludens* (Zot).

*Salmonella typhi* (fiebre tifoidea): los antígenos incluyen polisacáridos capsulares preferentemente conjugados (Vi, por ejemplo, vax-TyVi).

5 *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme): los antígenos incluyen lipoproteínas (tales como OspA, OspB, Osp C y Osp D), otras proteínas de superficie tales como proteínas relacionadas con OspE (Erps), proteínas de unión a decorina (tales como DbpA) y proteínas VI antigénicamente variables tales como antígenos asociados a P39 y P13 (una proteína de membrana integral, [143]) y proteína de variación antigénica VIsE [144].

*Porphyromonas gingivalis*: los antígenos incluyen la proteína de membrana externa (OMP). Véase también la ref. 145.

10 *Klebsiella*: los antígenos incluyen una OMP, que incluye OMP A, o un polisacárido opcionalmente conjugado con toxoide tetánico.

15 Otros antígenos bacterianos pueden ser antígenos capsulares, antígenos de sacárido o antígenos de proteína de cualquiera de los anteriores. Otros antígenos bacterianos también pueden incluir una preparación de vesículas de la membrana externa (OMV). Adicionalmente, los antígenos incluyen versiones vivas, atenuadas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Los antígenos usados en la presente invención pueden derivarse de bacterias Gram-negativas y/o Gram-positivas. Los antígenos usados en la presente invención pueden derivarse de bacterias aerobias y/o anaerobias.

#### B. Antígenos víricos

20 Los antígenos víricos adecuados para uso en la invención incluyen virus inactivados (o destruidos), virus atenuados, formulaciones de virus fraccionados, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas víricas que pueden aislarse, purificarse o derivarse de un virus, y partículas similares a virus (VLP). Los antígenos víricos pueden derivarse de virus propagados en cultivo celular u otro sustrato. Alternativamente, los antígenos víricos pueden expresarse recombinantemente. Los antígenos víricos incluyen preferentemente epitopes que se exponen sobre la superficie del virus durante al menos una fase de su ciclo vital. Los antígenos víricos se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos o cepas aisladas. Los antígenos víricos incluyen antígenos derivados de uno o más de los virus expuestos a continuación, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación.

25 *Ortomixovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un ortomixovirus tal como la gripe A, B y C. Los antígenos de ortomixovirus pueden seleccionarse de una o más de las proteínas víricas que incluyen hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos preferidos incluyen HA y NA.

30 Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas de gripe interpandémica (anuales). Alternativamente, los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas con la posibilidad de producir un brote pandémico (es decir, cepas de gripe con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en cepas actualmente en circulación, o cepas de gripe que son patogénicas en sujetos aviares y tienen la posibilidad de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de gripe que son patogénicas para seres humanos).

35 *Virus Paramyxoviridae*: los antígenos víricos pueden derivarse de virus *Paramyxoviridae* tales como pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV) y morbillivirus (sarampión). [146-148].

40 *Pneumovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un pneumovirus tal como el virus sincicial respiratorio (VSR), virus sincicial respiratorio bovino, virus de la neumonía de ratones y virus de la rinotraqueitis del pavo. Preferentemente, el pneumovirus es VSR. Los antígenos de pneumovirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas que incluyen las proteínas de superficie fusión (F), glucoproteína (G) y proteína hidrófoba pequeña (SH), proteínas de matriz M y M2, proteínas de nucleocápside N, P y L y proteínas no estructurales NS1 y NS2. Los antígenos de pneumovirus preferidos incluyen F, G y M. Véase, por ejemplo, la ref. 149. Los antígenos de pneumovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV.

45 *Paramixovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un paramixovirus tal como los tipos 1-4 del virus paragripal (PIV), paperas, virus de Sendai, virus simio 5, virus paragripal bovino y virus de la enfermedad de Newcastle. Preferentemente, el paramixovirus es PIV o paperas. Los antígenos de paramixovirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteínas de fusión F1 y F2, nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de matriz (M). Las proteínas de paramixovirus preferidas incluyen HN, F1 y F2. Los antígenos de paramixovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV. Las vacunas contra la paperas comercialmente disponibles incluyen virus de las paperas atenuado vivo en tanto una forma monovalente como en combinación con vacunas

contra el sarampión y la rubeola (MMR).

*Morbillivirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un morbillivirus tal como el sarampión. Los antígenos de morbillivirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina (H), glucoproteína (G), factor de fusión (F), proteína grande (L), nucleoproteína (NP), polimerasa fosfoproteína (P) y matriz (M). Las vacunas contra el sarampión comercialmente disponibles incluyen virus del sarampión atenuado vivo, normalmente en combinación con paperas y rubeola (MMR).

*Picornavirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de picornavirus tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. Se prefieren antígenos derivados de enterovirus tales como virus de la poliomielitis. Véanse las refs. 150 y 151.

*Enterovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un enterovirus tal como los tipos 1, 2 ó 3 del virus de la poliomielitis, tipos 1 a 22 y 24 del virus Coxsackie A, tipos 1 a 6 del virus Coxsackie B, tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 de ecovirus (virus ECHO) y enterovirus 68 a 71. Preferentemente, el enterovirus es el virus de la poliomielitis. Los antígenos de enterovirus se seleccionan preferentemente de una o más de las siguientes proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP4. Las vacunas contra la poliomielitis comercialmente disponibles incluyen vacuna contra la poliomielitis inactivada (IPV) y vacuna oral contra el virus de la poliomielitis (OPV).

*Heparnavirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un heparnavirus tal como virus de la hepatitis A (VHA). Las vacunas contra el VHA comercialmente disponibles incluyen vacuna contra el VHA inactivado [152,153].

*Togavirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un togavirus tal como un rubivirus, un alfavirus o un arterivirus. Se prefieren antígenos derivados de rubivirus tales como el virus de la rubeola. Los antígenos de togavirus pueden seleccionarse de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 o NSP-4. Los antígenos de togavirus se seleccionan preferentemente de E1, E2 o E3. Las vacunas contra la rubeola comercialmente disponibles incluyen un virus adaptado al frío vivo, normalmente en combinación con vacunas contra las paperas y el sarampión (MMR).

*Flavivirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un flavivirus tal como la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), el dengue (tipos 1, 2, 3 ó 4), fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis rusa de primavera-verano, encefalitis de Powassan. Los antígenos de flavivirus pueden seleccionarse de PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Los antígenos de flavivirus se seleccionan preferentemente de PrM, M y E. La vacuna contra la ETG comercialmente disponible incluye vacunas de virus inactivados.

*Pestivirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un pestivirus tal como diarrea viral bovina (DVB), peste porcina clásica (PPC) o enfermedad de Border (BDV).

*Hepadnavirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un hepadnavirus tal como virus de la hepatitis B. Los antígenos de hepadnavirus pueden seleccionarse de antígenos de superficie (L, M y S), antígenos de núcleo (HBc, HBe). Las vacunas contra el VHB comercialmente disponibles incluyen vacunas de subunidades que comprenden el antígeno de superficie proteína S [153,154].

*Virus de la hepatitis C*: los antígenos víricos pueden derivarse de un virus de la hepatitis C (VHC). Los antígenos del VHC pueden seleccionarse de uno o más de la poliproteína E1, E2, E1/E2, NS3/45, poliproteína del núcleo NS 3/45, núcleo y/o péptidos de las regiones no estructurales [155,156].

*Rabdovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un rabdovirus tal como un lyssavirus (virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV). Los antígenos de rabdovirus pueden seleccionarse de glucoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L), proteínas no estructurales (NS). Las vacunas contra el virus de la rabia comercialmente disponibles comprenden virus destruidos cultivados en células diploides humanas o células de pulmón rhesus fetal [157,158].

*Caliciviridae*: los antígenos víricos pueden derivarse de Caliciviridae tales como virus Norwalk y virus similares a Norwalk tales como el virus de Hawaii y el virus de las montañas nevadas.

*Coronavirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un coronavirus, SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (BIA), virus de la hepatitis del ratón (VHR) y virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT). Los antígenos de coronavirus pueden seleccionarse de glicoproteína de la espícula (S), de la envuelta (E), de matriz (M), de nucleocápside (N) y/o de hemaglutinina-esterasa (HE). Preferentemente, el antígeno de coronavirus se deriva de un virus de SARS. Los antígenos víricos de SARS se describen en la ref. 159.

*Retrovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un retrovirus tal como un oncovirus, un lentivirus o un espumavirus. Los antígenos de oncovirus pueden derivarse de HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-5. Los antígenos de lentivirus pueden derivarse de VIH-1 o VIH-2. Los antígenos de retrovirus pueden seleccionarse de gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpu y vpr. Los antígenos de VIH pueden seleccionarse de gag (p24

gag y p55 gag), env (gp160, gp120 y gp41), pol, tat, nef, rev vpu, miniproteínas, (preferentemente p55 gag y gp140v delete). Los antígenos de VIH pueden derivarse de una o más de las siguientes cepas: VIH<sub>IIIb</sub>, VIH<sub>SF2</sub>, VIH<sub>LAV</sub>, VIH<sub>LAI</sub>, VIH<sub>MN</sub>, VIH-1<sub>CM235</sub>, VIH-1<sub>US4</sub>.

5 *Reovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un reovirus tal como un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus. Los antígenos de reovirus pueden seleccionarse de proteínas estructurales λ1, λ2, λ3, μ1, μ2, σ1, σ2, ó σ3, o proteínas no estructurales σNS, μNS o σ1s. Los antígenos de reovirus preferidos pueden derivarse de un rotavirus. Los antígenos de rotavirus pueden seleccionarse de VP1, VP2, VP3, VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 y/o NSP5. Los antígenos de rotavirus preferidos incluyen VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8) y VP7.

10 *Parvovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un parvovirus tal como el parvovirus B19. Los antígenos de parvovirus pueden seleccionarse de VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 y/o NS-2. Preferentemente, el antígeno de parvovirus es la proteína de la cápside VP-2.

*Virus de la hepatitis delta (VHD)*: los antígenos víricos pueden derivarse de VHD, particularmente el antígeno δ del VHD (véase, por ejemplo, la ref. 160).

15 *Virus de la hepatitis E (VHE)*: los antígenos víricos pueden derivarse de VHE.

*Virus de la hepatitis G (VHG)*: los antígenos víricos pueden derivarse de VHG.

20 *Virus del herpes humano*: los antígenos víricos pueden derivarse de un virus del herpes humano tal como el virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH6), virus del herpes humano 7 (VHH7) y virus del herpes humano 8 (VHH8). Los antígenos del virus del herpes humano pueden seleccionarse de proteínas inmediatas tempranas (α), proteínas tempranas (β) y proteínas tardías (γ). Los antígenos del VHS pueden derivarse de cepas de VHS-1 o VHS-2. Los antígenos del VHS pueden seleccionarse de glicoproteínas gB, gC, gD y gH, proteína de fusión (gB) o proteínas de inmunoescape (gC, gE o gI). Los antígenos del VVZ pueden seleccionarse de proteínas de núcleo, de nucleocápside, del tegumento o de la envuelta. Una vacuna contra el VVZ atenuado vivo está comercialmente disponible. Los antígenos del VEB pueden seleccionarse de proteínas de antígeno temprano (EA), antígeno de la cápside viral (VCA) y glicoproteínas del antígeno de membrana (MA). Los antígenos de CMV pueden seleccionarse de proteínas de la cápside, glicoproteínas de la envuelta (tales como gB y gH) y proteínas del tegumento

30 *Papovavirus*: los antígenos pueden derivarse de papovavirus tales como el virus del papiloma y el virus del polioma. Los virus del papiloma incluyen los serotipos de VPH 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 y 65. Preferentemente, los antígenos del VPH se derivan de los serotipos 6, 11, 16 ó 18. Los antígenos del VPH pueden seleccionarse de proteínas de la cápside (L1) y (L2), o E1 - E7, o fusiones de las mismas. Los antígenos del VPH se formulan preferentemente en partículas similares a virus (VLP). Los virus del polioma incluyen virus BK y virus JK. Los antígenos del virus del polioma pueden seleccionarse de VP 1, VP2 o VP3.

### C. Antígenos fúngicos

Los antígenos fúngicos pueden derivarse de uno o más de los hongos expuestos a continuación.

40 Los antígenos fúngicos pueden derivarse de dermatofitos, que incluyen: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*

45 Los patógenos fúngicos incluyen *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium mameffeii*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp., *Mortierella* spp., *Cunninghamella* spp., *Saksenaeeae* spp., *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Helminthosporium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Monolinia* spp., *Rhizoctonia* spp., *Paecilomyces* spp., *Pithomyces* spp. y *Cladosporium* spp.

Los procedimientos para producir un antígeno fúngico son muy conocidos en la técnica [161]. En un

procedimiento preferido, una fracción solubilizada se extrae y se separa de una fracción insoluble que puede obtenerse a partir de células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular, caracterizado porque el procedimiento comprende las etapas de: obtener células fúngicas vivas; obtener células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; romper las células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; obtener una fracción insoluble; y extraer y separar una fracción solubilizada de la fracción insoluble.

#### D. Antígenos de ETS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Tales antígenos pueden proporcionar profilaxis o terapia para ETS tales como clamidia, herpes genital, hepatitis (tal como VHC), condilomas acuminados, gonorrea, sífilis y/o chancroide [162]. Los antígenos pueden derivarse de una o más ETS bacterianas o víricas. Los antígenos de ETS víricas para uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, VIH, virus del herpes simple (VHS-1 y VHS-2), virus del papiloma humano (VPH) y hepatitis (VHC). Los antígenos de ETS bacterianas para uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### E. Antígenos respiratorios

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de un patógeno que produce enfermedad respiratoria. Por ejemplo, antígenos respiratorios pueden derivarse de un virus respiratorio tal como ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), VVZ y coronavirus (SARS). Los antígenos respiratorios pueden derivarse de una bacteria que produce enfermedad respiratoria tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### F. Antígenos de vacunas pediátricas

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos pediátricos. Los sujetos pediátricos tienen normalmente menos de aproximadamente 3 años, o menos de aproximadamente 2 años, o menos de aproximadamente 1 año. Los antígenos pediátricos pueden administrarse múltiples veces durante el transcurso de 6 meses, 1, 2 ó 3 años. Los antígenos pediátricos pueden derivarse de un virus que puede elegir como diana poblaciones pediátricas y/o un virus al que las poblaciones pediátricas son susceptibles de ser infectadas. Los antígenos víricos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), enterovirus (poliomielitis), VHB, coronavirus (SARS) y virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB). Los antígenos bacterianos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), tipo B de *Haemophilus influenzae* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B) y *Escherichia coli*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### G. Antígenos adecuados para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos. Tales individuos pueden necesitar ser vacunados más frecuentemente, con mayores dosis o con formulaciones complementarias para mejorar su respuesta inmunitaria a los antígenos elegidos como diana. Los antígenos que pueden elegirse como diana para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos incluyen antígenos derivados de uno o más de los siguientes patógenos: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (Rubeola), enterovirus (polio), VHB, coronavirus (SARS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV). Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### H. Antígenos adecuados para uso en vacunas para adolescentes

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos adolescentes. Los adolescentes pueden estar en necesidad de un refuerzo de un antígeno pediátrico previamente administrado. Los antígenos pediátricos que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se

han descrito anteriormente. Además, los adolescentes pueden elegirse como diana para recibir antígenos derivados de un patógeno de ETS con el fin de garantizar inmunidad protectora o terapéutica antes del comienzo de la actividad sexual. Los antígenos de ETS que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se han descrito anteriormente.

## 5 I. Antígenos tumorales

10 Una realización de la invención implica un antígeno tumoral o antígeno de cáncer. Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales que contienen péptidos tales como un antígeno tumoral de polipéptido o antígenos tumorales de glicoproteína. Un antígeno tumoral también puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene sacárido tal como un antígeno tumoral de glicolípido o un antígeno tumoral de gangliósido. El antígeno tumoral puede ser adicionalmente, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene polinucleótido que expresa un antígeno tumoral que contiene polipéptido, por ejemplo, una construcción de vector de ARN o una construcción de vector de ADN tal como ADN de plásmido.

15 Los antígenos tumorales apropiados para la práctica de la presente invención engloban una amplia variedad de moléculas tales como (a) antígenos tumorales que contienen polipéptidos, incluyendo polipéptidos (que pueden oscilar, por ejemplo, de 8-20 aminoácidos de longitud, aunque también son comunes longitudes fuera de este intervalo), lipopolipéptidos y glicoproteínas, (b) antígenos tumorales que contienen sacáridos, incluyendo polisacáridos, mucinas, gangliósidos, glicolípidos y glicoproteínas, y (c) polinucleótidos que expresan polipéptidos antigénicos.

20 Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, (a) moléculas de longitud completa asociadas a células cancerosas, (b) homólogos y formas modificadas de las mismas que incluyen moléculas con porciones delecionadas, añadidas y/o sustituidas, y (c) fragmentos de las mismas. Los antígenos tumorales pueden proporcionarse en forma recombinante. Los antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, antígenos limitados a la clase I reconocidos por linfocitos CD8+ o antígenos limitados a la clase II reconocidos por linfocitos CD4+.

25 En la técnica se conocen numerosos antígenos tumorales que incluyen: (a) antígenos de cáncer de testículo tales como los polipéptidos de las familias NY-ESO-1, SSX2, SCP1, además de RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que pueden usarse, por ejemplo, para tratar melanoma, tumores de pulmón, cabeza y cuello, CPCNP, mama, gastrointestinal y vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociada a diversos tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociada a, por ejemplo, melanoma, cáncer pancreático y cáncer colorrectal), CDK4 (asociada a, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociada a, por ejemplo, melanoma), caspasa 8 (asociada a, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociada a, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta-catenina (asociadas a, por ejemplo, melanoma), TCR (asociada a, por ejemplo, linfoma no Hodgkin de linfocitos T), BCR-abl (asociada a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), triosafosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT, (c) antígenos expresados en exceso, por ejemplo, galectina 4 (asociada a, por ejemplo, cáncer colorrectal), galectina 9 (asociada a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociada a, por ejemplo, diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada a, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada a, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociada a, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociada a, por ejemplo, cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), alfa-fetoproteína (asociada a, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociada a, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada a, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica telomerasa, MUC-1 (asociadas a, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario), G-250 (asociada a, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociada a, por ejemplo, cáncer de mama, de colon) y antígeno carcinoembrionario (asociado a, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal tales como cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocito tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína 1 relacionada con tirosinasa/TRP1 y proteína 2 relacionada con tirosinasa/TRP2 (asociada a, por ejemplo, melanoma), (e) antígenos asociados a próstata tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados a por ejemplo, cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados a mieloma y linfomas de linfocitos B, por ejemplo), y (g) otros antígenos tumorales tales como antígenos que contienen polipéptidos y sacáridos que incluyen (i) glicoproteínas tales como sialil Tn y sialil Le<sup>x</sup> (asociadas a, por ejemplo, cáncer de mama y colorrectal), además de diversas mucinas; las glicoproteínas pueden acoplarse a una proteína portadora (por ejemplo, MUC-1 puede acoplarse a KLH); (ii) lipopolipéptidos (por ejemplo, MUC-1 ligado a un resto de lípido); (iii) polisacáridos (por ejemplo, hexasacárido sintético Globo H) que pueden acoplarse a proteínas portadoras (por ejemplo, a KLH), (iv) gangliósidos tales como GM2, GM12, GD2, GD3 (asociados a, por ejemplo, cáncer cerebral, de pulmón, melanoma), que también pueden acoplarse a proteínas portadoras (por ejemplo, KLH).

60 Antígenos tumorales adicionales que se conocen en la técnica incluyen p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MIL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus del papiloma humano (VPH) que incluyen E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de linfocitos T humano, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9,

CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2\proteína asociada ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y similares. Éstos, además de otros componentes celulares, se describen, por ejemplo, en la referencia 163 y las referencias citadas en su interior.

Los antígenos que contienen polinucleótidos según la presente invención comprenden normalmente polinucleótidos que codifican antígenos de cáncer de polipéptidos tales como aquellos enumerados anteriormente. Los antígenos que contienen polinucleótidos preferidos incluyen construcciones de vectores de ADN o ARN tales como vectores de plásmido (por ejemplo, pCMV) que pueden expresar antígenos de cáncer de polipéptidos *in vivo*. Los antígenos tumorales pueden derivarse, por ejemplo, de componentes celulares mutados o alterados. Después de la alteración, los componentes celulares ya no realizan sus funciones reguladoras y, por tanto, la célula puede experimentar un crecimiento incontrolado. Ejemplos representativos de componentes celulares alterados incluyen ras, p53, Rb, proteína alterada codificada por el gen del tumor de Wilms, ubiquitina, mucina, proteína codificada por los genes DCC, APC y MCC, además de receptores o estructuras similares a receptores tales como neu, receptor de la hormona tiroidea, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del factor estimulante de colonias (CSF). Éstos, además de otros componentes celulares, se describen, por ejemplo, en la ref. 164 y las referencias citadas en su interior.

Adicionalmente, los antígenos bacterianos y víricos pueden usarse conjuntamente con las composiciones de la presente invención para el tratamiento de cáncer. En particular, proteínas portadoras tales como CRM197, toxoide tetánico o antígeno de *Salmonella typhimurium* pueden usarse junto con/conjugarse con compuestos de la presente invención para el tratamiento de cáncer. Las terapias de combinación con antígeno de cáncer mostrarán un aumento de la eficacia y biodisponibilidad en comparación con terapias existentes.

Información adicional sobre antígenos de cáncer o tumorales puede encontrarse, por ejemplo, en la referencia 165 (por ejemplo, las tablas 3 y 4), en la referencia 166 (por ejemplo, la tabla 1) y en las referencias 167 a 189.

La inmunización también puede usarse contra enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, usando Abeta como antígeno [190].

#### J. Formulaciones de antígeno

En otros aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de producción de micropartículas que tienen antígenos adsorbidos. Los procedimientos comprenden: (a) proporcionar una emulsión dispersando una mezcla que comprende (i) agua, (ii) un detergente, (iii) un disolvente orgánico y (iv) un polímero biodegradable seleccionado del grupo que está constituido por un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxi-butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato. El polímero está normalmente presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30% con respecto al disolvente orgánico, mientras que el detergente está normalmente presente en la mezcla a una relación de detergente con respecto a polímero en peso/peso de aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,1:1 (más normalmente aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,1:1, aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1, o aproximadamente 0,005:1 a aproximadamente 0,1:1); (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión; y (c) adsorber un antígeno sobre la superficie de las micropartículas. En ciertas realizaciones, el polímero biodegradable está presente a una concentración de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 10% con respecto al disolvente orgánico.

Las micropartículas para uso en este documento se formarán a partir de materiales que son esterilizables, no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen, sin limitación, poli( $\alpha$ -hidroxiácido), ácido polihidroxi-butírico, policaprolactona, poliortoéster, polianhídrido, PACA y policianoacrilato. Preferentemente, las micropartículas para uso con la presente invención se derivan de un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), en particular de una poli(lactida) ("PLA") o un copolímero de D,L-lactida y glicolida o ácido glicólico, tal como una poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLG" o "PLGA"), o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las micropartículas pueden derivarse de cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una variedad de relaciones de lactida:glicolida cuya selección será ampliamente un asunto de elección que depende en parte de la macromolécula coadministrada. Estos parámetros se tratan más completamente más adelante.

Procedimientos de formulación y antígenos adicionales (especialmente antígenos tumorales) se proporcionan en la ref. 191.

#### Procedimientos médicos y usos

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que van a tratarse pueden ser animales; en particular pueden tratarse sujetos humanos. Las

composiciones pueden formularse como vacunas que son particularmente útiles para vacunar niños y adolescentes. Pueden administrarse por vías sistémicas y/o mucosas.

5 Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La administración directa de las composiciones será generalmente parenteral (por ejemplo, mediante inyección, tanto subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente como intramuscularmente, o se administra al espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también pueden administrarse a una lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios y administraciones transdérmicas o transcutáneas (por ejemplo, véase la ref. 192), agujas e hiposprays. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis (por ejemplo, que incluye dosis de refuerzo).

10 Las vacunas de la invención son preferentemente estériles. Están preferentemente libres de pirógenos. Están preferentemente tamponadas, por ejemplo, a entre pH 6 y pH 8, generalmente aproximadamente a pH 7. Si una vacuna comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [193].

15 Las vacunas de la invención pueden comprender detergente (por ejemplo, un Tween, tal como Tween 80) a bajos niveles (por ejemplo, <0,01%). Las vacunas de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o trehalosa, por ejemplo, a aproximadamente 15 mg/ml, particularmente si van a liofilizarse.

20 Las dosis óptimas de antígenos individuales pueden evaluarse empíricamente. Sin embargo, en general, los antígenos de sacárido de la invención se administrarán a una dosis de entre 0,1 y 100 µg de cada sacárido por dosis, con un volumen de dosificación típico de 0,5 ml. La dosis está normalmente entre 5 y 20 µg por sacárido por dosis. Estos valores se miden como sacárido.

25 Las vacunas según la invención pueden ser tanto profilácticas (es decir, para prevenir la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección), pero normalmente serán profilácticas.

La invención proporciona un conjugado de la invención para uso en medicina.

30 La invención es útil en un procedimiento de provocar una respuesta inmunitaria en un paciente que comprende administrar a un paciente un conjugado según la invención. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora contra enfermedad meningocócica, y puede comprender una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular. El paciente es preferentemente un niño. El procedimiento puede provocar una respuesta de refuerzo en un paciente que ya ha sido sensibilizado a meningococos.

35 El medicamento es preferentemente una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna). El medicamento es preferentemente para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad producida por una *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, gonorrea, etc.). Por tanto, se prefiere la prevención y/o el tratamiento de meningitis bacteriana.

Las vacunas pueden probarse en modelos animales convencionales (por ejemplo, véase la ref. 194).

40 Un kit puede comprender a) un primer conjugado de la invención y b) un segundo conjugado de la invención.

#### **Adyuvantes**

Los conjugados de la invención pueden administrarse conjuntamente con otros agentes inmunoreguladores. En particular, las composiciones incluirán normalmente un adyuvante. Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

45 *A. Composiciones que contienen minerales*

50 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales tales como sales de aluminio y sales de calcio. Tales composiciones minerales pueden incluir sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc., [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 195], o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso del fosfato), tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristal, amorfo, etc.), y prefiriéndose la adsorción a la(s) sal(es). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [196].

55 Las sales de aluminio pueden incluirse en composiciones de la invención de forma que la dosis de Al<sup>3+</sup> esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

Un adyuvante de fosfato de aluminio típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de  $\text{Al}^{3+}/\text{ml}$ . La adsorción con una baja dosis de fosfato de aluminio puede usarse, por ejemplo, entre 50 y 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{3+}$  por conjugado por dosis. Si se usa un fosfato de aluminio y se desea que no se adsorba un antígeno al adyuvante, esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en disolución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón fosfato).

#### B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para uso como adyuvantes con conjugados de la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formulada en partículas submicrométricas usando un microfluidizador) [Capítulo 10 de la ref. 195; véanse también las refs. 197-199]. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidades trivalente del virus de la gripe FLUAD™. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.

Los adyuvantes particularmente preferidos para uso en las composiciones son emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para uso en este documento son emulsiones de escualeno/agua que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE tales como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5% peso/volumen de escualeno, 0,25-1,0% peso/volumen de Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano) y/o Span 85 al 0,25-1,0% (trioleato de sorbitano), y opcionalmente N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE). Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas, los procedimientos de preparación de las mismas y los agentes inmunoestimulantes tales como muramipéptidos para uso en las composiciones se describen en detalle en las referencias 197 y 200-201.

Puede usarse una emulsión de escualeno, un tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de tocoferol y del 0,3 al 3% de Tween 80, y la relación de peso de escualeno:tocoferol es preferentemente  $\leq 1$  ya que esto proporciona una emulsión más estable. Una emulsión tal puede prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una disolución al 2%, mezclando luego 90 ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno), microfluidizando luego la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm.

Puede usarse una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100).

Puede usarse una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxamer 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para muramildipéptidos y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [202] (Thr-MDP al 0,05-1%, escualeno al 5%, Pluronic L121 al 2,5% y polisorbato 80 al 0,2%). También puede usarse sin Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [203] (escualeno al 5%, Pluronic L121 al 1,25% y polisorbato 80 al 0,2%). Se prefiere la microfluidización.

También pueden usarse como adyuvantes adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

#### C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 195]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes de conjugados de la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS 17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 204. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol tal como colesterol [205].

Las combinaciones de saponinas y colesteroles pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 195]. Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las refs. 205-207. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de

detergente(s) adicional(es) [208].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en las refs. 209 y 210.

#### D. Virosomas y partículas similares a virus

5 Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas víricos nativos. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), virus de la hepatitis B (tal como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q $\beta$  (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago  $\phi$ , fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en las refs. 211-216. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 217

#### E. Derivados bacterianos o microbianos

20 Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbiano tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas.

25 Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en la ref. 218. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m [218]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529 [219,220].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 221 y 222.

30 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar ligada por un enlace fosfato a una guanósina). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimuladores.

35 Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 223, 224 y 225 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, sustitución de guanósina con 2'-desoxi-7-deazaguanósina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en las refs. 226-231.

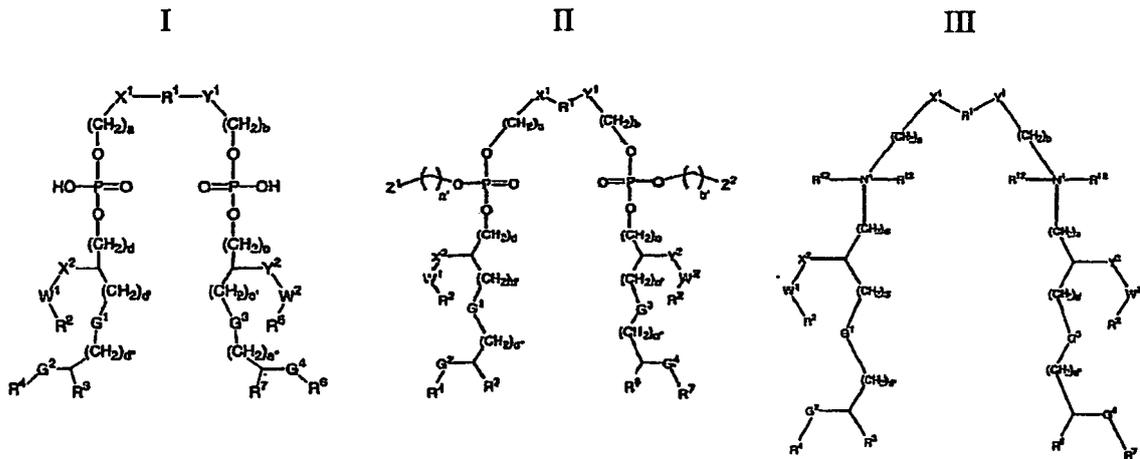
40 La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [232]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las refs. 233-235. Preferentemente, el CpG es el ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las refs. 232 y 236-238.

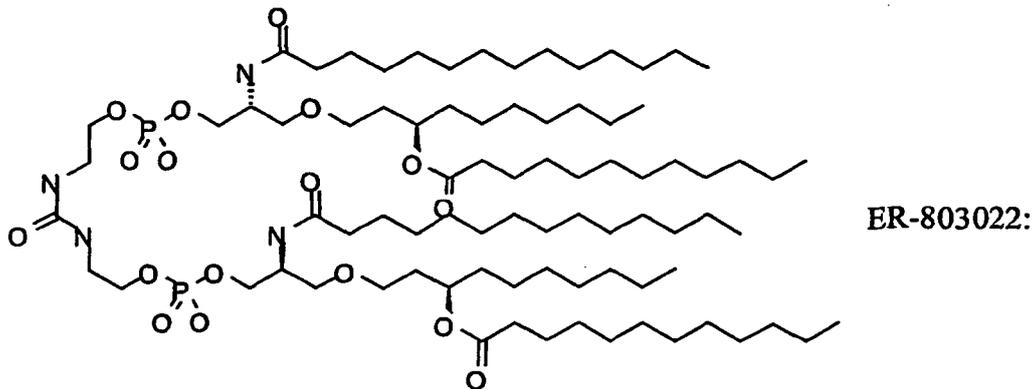
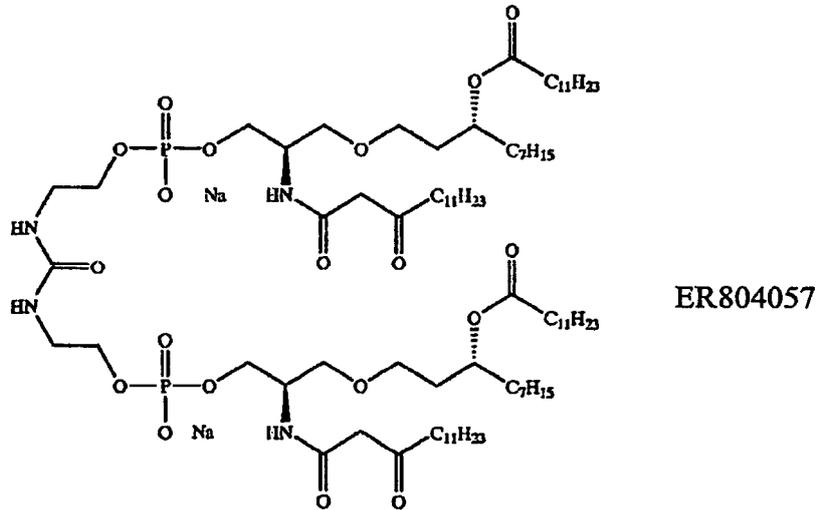
45 Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 239 y como adyuvantes parenterales en la ref. 240. La toxina o el toxoide están preferentemente en forma de una holotoxina que comprende tanto subunidades A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las refs. 241-248. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 249, incorporadas específicamente en este documento por referencia en su totalidad.

Los compuestos de fórmula I, II o III, o sales de los mismos, también puede usarse como

adyuvantes:



como se define en la referencia 250, tales como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 o 'ER 804057', por ejemplo:



5 F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [251], IL-23, IL-27 [252], etc.) [253], interferones (por ejemplo, interferón  $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral y proteína alfa-1 inflamatoria de macrófagos (MIP-1 alfa) y MIP-1 beta [254].

*G. Bioadhesivos y mucoadhesivos*

5 También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [255] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [256].

*H. Micropartículas*

10 Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico tal como CTAB).

*I. Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 195)*

15 Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las refs. 257-259.

*J. Formulaciones de polioxietiléneteres y polioxietilénésteres*

20 Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen polioxietiléneteres y polioxietilénésteres [260]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol [261], además de tensioactivos de polioxietilenalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [262]. Los polioxietiléneteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

*K. Polifosfaceno (PCPP)*

25 Las formulaciones de PCPP (poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno]) se describen, por ejemplo, en las refs. 263 y 264.

*L. Muramilpéptidos*

30 Ejemplos de muramilpéptidos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

*M. Compuestos de imidazoquinolona*

35 Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descrito adicionalmente en las refs. 265 y 266.

*N. Compuestos de tiosemicarbazona*

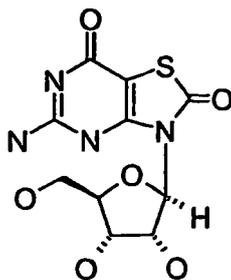
40 Ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para compuestos, todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen aquellos descritos en la ref. 267. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de la sangre periférica humana para la producción de citocinas tales como TNF-α.

*O. Compuestos de triptantrina*

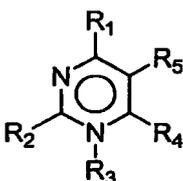
45 Ejemplos de compuestos de triptantrina, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para compuestos, todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen aquellos descritos en la ref. 268. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de la sangre periférica humana para la producción de citocinas tales como TNF-α.

*P. Análogos de nucleósidos*

50 Los diversos análogos de nucleósidos pueden usarse como adyuvantes tales como (a) isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



y profármacos de los mismos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en las referencias 269 a 271; (f) un compuesto que tiene la fórmula:



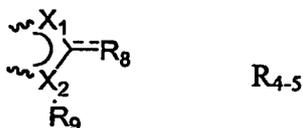
5 en la que:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente H, halógeno, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -OH, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, alquilo C<sub>1-6</sub>, o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido;

10

R<sub>3</sub> está ausente, es H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente H, halógeno, heterociclilo, heterociclilo sustituido, -C(O)-R<sub>d</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, o se unen juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R<sub>4-5</sub>:



15

lográndose la unión en los enlaces indicados por un

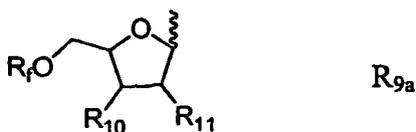


X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son cada uno independientemente N, C, O ó S;

R<sub>8</sub> es H, halógeno, -OH, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, -OH, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-R<sub>c</sub>, -O-(alquilo C<sub>1-6</sub>), -S(O)<sub>p</sub>R<sub>c</sub> o -C(O)-R<sub>d</sub>;

20

R<sub>9</sub> es H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R<sub>9a</sub> en la que R<sub>9a</sub> es:



lográndose la unión en el enlace indicado por un



R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente H, halógeno, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub> o -OH;

cada R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, -C(O)R<sub>d</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>;

cada R<sub>c</sub> es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C<sub>1-6</sub> o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido;

5

cada R<sub>d</sub> es independientemente H, halógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-6</sub>), -NH(alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido), -N(alquilo C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -N(alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido)<sub>2</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> o heterociclilo;

cada R<sub>e</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

10

cada R<sub>f</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, -C(O)R<sub>d</sub>, fosfato, difosfato o trifosfato;

cada n es independientemente 0, 1, 2 ó 3;

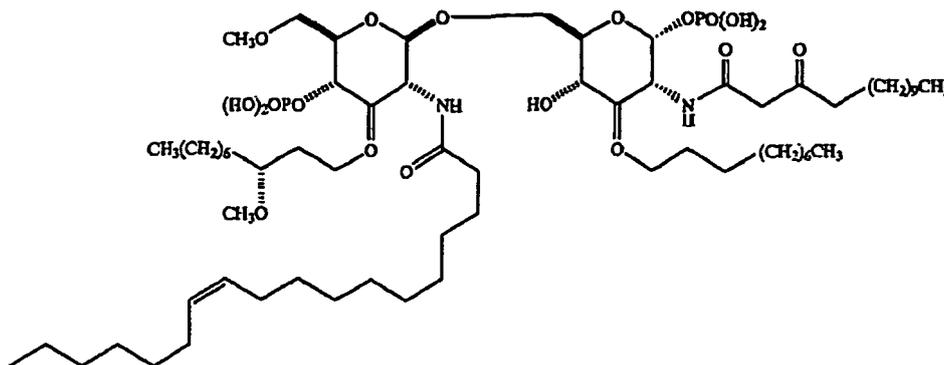
cada p es independientemente 0, 1 ó 2; ó

15

o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

*Q. Lípidos ligados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato*

Los adyuvantes que contienen lípidos ligados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato incluyen el antagonista de TLR4 E5564 [272,273]:



20

*R. Inmunopotenciadores de moléculas pequeñas (SMIP)*

Los SMIP incluyen:

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

25

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

30

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;

- 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;

- 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina ;

- 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol;
- acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etilo;
- 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona;
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 5 • N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1-(4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2-metilpropan-2-ol;
- 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol;
- 10 • N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina.

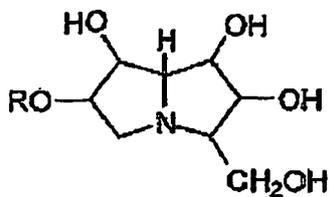
#### S. *Proteosomas*

- 15 Un adyuvante es una preparación de proteosomas de proteínas de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacárido derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en la que las preparaciones de proteosomas de proteínas de membrana externa y liposacáridos forman un complejo de adyuvante no covalente estable. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo que comprende membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Se han usado como adyuvantes para vacunas contra la gripe [274].

#### T. *Otros adyuvantes*

- 20 Otras sustancias que actúan de agentes inmunoestimulantes se desvelan en las referencias 195 y 275. Otras sustancias adyuvantes útiles incluyen:

- 5'-monofosfato de metil-inosina ("MIMP") [276].
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado [277], tal como uno que tiene la fórmula:



- 25 en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo saturados o insaturados lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- $\alpha$ -D-glucopiranosina, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

- Una gamma-inulina [278] o derivado de la misma, tal como algamulina.
- 30 • Compuestos desvelados en la referencia 279.
- Compuestos desvelados en la referencia 280 que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazol-quinolinona (ABIQ) [281,282], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinacilina, compuestos de pirrol [283], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol [284].
- 35 • Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [285].

Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (normalmente neutro) tal como bromuro de

aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanamino-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o bromuro de aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanamino-dioleoifosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren formulaciones que contienen sales de ( $\pm$ )-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradecenoiloxi)-1-propanamino [286].

5 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes combinaciones como composiciones de adyuvante en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [287]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [288]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [289]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [290]; (6) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80™ al 0,4%, polímero de bloque de Pluronic al 5% L121 y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; (7) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que está constituido por monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dMPL); y (9) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

## 20 **Definiciones**

El término "que comprende" engloba "que incluye", además de "está constituido", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

25 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ . Todos los valores numéricos en este documento pueden considerarse que están calificados por "aproximadamente", a menos que el contexto indique de otro modo.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Si es necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

## 30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 muestra las diversas combinaciones posibles de portador y antígeno de sacárido; (A) dos conjugados monovalentes, (B) un conjugado monovalente que demuestra que cada molécula de proteína portadora puede unirse a más de una molécula de antígeno de sacárido y (C) un conjugado multivalente en el que más de un sacárido antigénicamente distinto está unido a cada molécula de proteína portadora.

La Figura 2 muestra respuestas de anticuerpos de suero dirigidos contra IgG de MenC. Se inmunizaron tres veces grupos de seis ratones BALB/c con cantidades decrecientes de N19-MenC o CRM-MenC (2,5, 0,625, 0,156 y 0,039  $\mu\text{g}$  de MenC/dosis) y 0,5 mg de hidróxido de aluminio. Las muestras de suero se recogieron antes (pre) y después (pos 1, 2 y 3) de cada inmunización y se probaron individualmente para cuantificar títulos de anticuerpos IgG específicos para MenC. Cada punto representa el título de anticuerpos medio ( $\pm 1$  DE) de cada grupo en cada momento de tiempo.

La Figura 3 muestra respuestas de anticuerpos dirigidos contra IgG de portador en muestras de suero individuales de ratones inmunizados como se ha descrito antes. Como los ratones se inmunizaron con cantidades iguales de MenC en cualquier conjugado, la cantidad final de proteína portadora es ligeramente diferente en los grupos que reciben CRM-MenC y aquellos que recibieron N19-MenC, debido a la ligera diferencia en las relaciones de azúcar con respecto a proteína en las dos construcciones. Las muestras de suero se recogieron antes (pre) y después (pos 1, 2 y 3) de cada inmunización y se probaron individualmente para cuantificar anticuerpos IgG específicos para portador. Cada punto representa el título de anticuerpos medio ( $\pm$  DE) de cada grupo en cada momento de tiempo.

La Figura 4 muestra la actividad bactericida en muestras de suero de ratones inmunizados tres veces con cantidades decrecientes de N19-MenC o CRM-MenC (2,5  $\mu\text{g}$ , 0,625  $\mu\text{g}$ , 0,156  $\mu\text{g}$ , 0,039  $\mu\text{g}$  de MenC/dosis) y 0,5 mg de hidróxido de aluminio. Se muestran los títulos de anticuerpos bactericidas de muestras de suero reunidas recogidas antes (pre) y después (pos 1, 2 y 3) de cada inmunización. Los resultados se expresaron como valores recíprocos de la mayor dilución de suero que da más del 50% de destrucción bacteriana.

La Figura 5 muestra respuestas de anticuerpo de suero dirigido contra MenA y dirigido contra MenC. Se inmunizaron tres veces grupos de seis ratones BALB/c con cantidades decrecientes de N19-

- 5 MenA y N19-MenC tanto solo como combinado, o conjugados basados en CRM (0,625, 0,156 y 0,039  $\mu\text{g}$  de MenA y/o MenC/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio. Las muestras de suero se recogieron antes (pre) y después (pos 1, 2 y 3) de cada inmunización y se midieron títulos de anticuerpos dirigidos contra IgG de MenA y anticuerpos IgG específicos para MenC. Cada punto representa el título de anticuerpos medio ( $\pm 1$  DE) de cada grupo en cada momento de tiempo.
- 10 La Figura 6 muestra el efecto sobre las respuestas de anticuerpos específicos para serogrupo de un aumento de dosis de vacunas conjugadas combinadas tetravalentes de N19. Se inmunizaron grupos de seis ratones BALB/c con cantidades decrecientes de N19-MenACWY (líneas continuas) o CRM-MenACWY (líneas discontinuas) (de 2 a 0,074  $\mu\text{g}$  de cada PS Men/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio como adyuvante. Las inmunizaciones se realizaron en el día 0, 21 y 35 y se midieron los títulos de anticuerpos de suero específicos dirigidos contra IgG de MenA, dirigidos contra MenC, dirigidos contra MenW y dirigidos contra MenY después de cada inmunización (pos 1, 2 y 3). Cada punto representa el título de anticuerpos medio ( $\pm 1$  DE) de cada grupo en cada momento de tiempo.
- 15 La Figura 7 muestra la actividad bactericida contra el grupo C y W-135 en sueros individuales obtenidos a partir de ratones después de dos (pos 2) y tres (pos 3) inmunizaciones con 0,074  $\mu\text{g}$  de cada PS por dosis (N19-MenACWY o CRM-MenACWY). Los títulos se expresan como valores recíprocos de la mayor dilución de suero que da al menos el 50% de destrucción bacteriana. Cada columna representa títulos medios ( $\pm$  DE) del grupo en cada momento de tiempo.
- 20 La Figura 8 muestra la dinámica del perfil de afinidad de anticuerpos dirigidos contra MenC generados en ratones después de la inmunización con N19-MenACWY o CRM-MenACWY como se detalla en Materiales y procedimientos.
- 25 Se midieron títulos de IgG de alta afinidad en sueros reunidos mediante un procedimiento de ELISA modificado. Los resultados se expresan en índice de afinidad (IA) correspondiente al porcentaje de anticuerpos unidos después de la elución con 75 mM de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  de cada grupo después de cada inmunización (pos 1<sup>a</sup>, pos 2<sup>a</sup>, pos 3<sup>a</sup>).
- 30 La Figura 9 muestra respuestas de anticuerpos contra los portadores y sus proteínas parentales en sueros reunidos obtenidos después de la tercera inmunización. Cada punto representa el título de anticuerpos de cada grupo después de tres inmunizaciones como se ha descrito antes.
- 35 La Figura 10 muestra respuestas de anticuerpos de suero dirigidos contra MenA. Se inmunizaron tres veces grupos de seis ratones BALB/c con cantidades decrecientes de formulaciones tetravalentes preparadas mezclando juntos MenA conjugado tanto con N19 como con CRM con MenCWY conjugado tanto con CRM como con N19 (N19-MenA+CRM-MenCWY y viceversa CRM-MenA+ N19-MenCWY). Los grupos de control recibieron formulaciones tetravalentes que contenían un portador (N19-MenACWY o CRM-MenACWY). Los ratones recibieron cantidad decreciente de formulaciones tetravalentes (de 0,67  $\mu\text{g}$  a 0,074  $\mu\text{g}$  de cada PS Men/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio como adyuvante. Por sencillez, los inventores sólo informan de los resultados obtenidos después de la mayor (0,67  $\mu\text{g}$ ) y la menor (0,074  $\mu\text{g}$ ) dosificación de inmunización.
- 40 La Figura 11 muestra la actividad bactericida en suero de ratones BALB/c inmunizados tres veces con cantidad decreciente de formulaciones de bi-portadores o mono-portadores como se ha descrito anteriormente. Se midieron los títulos de anticuerpos bactericidas de muestras de suero reunidas recogidas después de la segunda (pos 2) y la tercera (pos 3) inmunización. Los resultados se expresaron como valores recíprocos de la mayor dilución de suero que da más del 50% de destrucción bacteriana.
- 45 La Figura 12 muestra respuestas de anticuerpos dirigidos contra IgG capsular. Se inmunizaron dos veces grupos de ratones BALB/c o C57BL/6 con N19-MenACWY o CRM-MenACWY (0,67 ó 0,22  $\mu\text{g}$ /dosis de cada PS Men) conjugados en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio. Las muestras de suero se recogieron antes (pre) y después (pos 1 y 2) de cada inmunización y se midieron títulos de anticuerpos IgG específicos para MenA, MenC, MenW, MenY. Cada punto representa el título de anticuerpos medio ( $\pm 1$  DE) de cada grupo en cada momento de tiempo.
- 50 La Figura 13 muestra respuestas de anticuerpos dirigidos contra IgG capsular. Se inmunizaron tres veces ratones BALB/c H-2 d , BALB/B H-2 b , B10.BR H-2 k , B10.D2N H-2 q y B10.D1 H-2 d con N19-MenACWY o CRM-MenACWY (0,67  $\mu\text{g}$ /dosis de cada PS) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio. Las muestras de suero se recogieron antes y después (pos 1, 2 y 3) de cada inmunización y se midieron títulos de anticuerpos IgG específicos para MenA, MenC, MenW, MenY.
- 55 Cada barra representa el título de anticuerpos medio y los símbolos se corresponden con el ratón individual de cada grupo en cada momento de tiempo.
- La Figura 14 muestra la actividad bactericida en suero de ratones con diferentes antecedentes

genéticos inmunizados tres veces con N19-MenACWY o CRM-MenACWY (0,67 µg de cada PS Men/dosis) y 0,06 mg de fosfato de aluminio. Se muestran los títulos de anticuerpos bactericidas de muestras de suero reunidas recogidas después de la tercera inmunización (pos 3). Los resultados se expresaron como valores recíprocos de la mayor dilución de suero que da más del 50% de destrucción bacteriana.

La Figura 15 muestra las respuestas de la proliferación de linfocitos T específicos para el epítipo N19. Se probaron células del bazo de ratones inmunizados tres veces con N19-MenACWY (6 µg de N19/dosis) para la proliferación *in vitro* en presencia de 0,9-30 µM de tres péptidos individuales (P2TT, P23TT, P30TT) y 0,312 a 10 µg/ml de proteína N19, libre o conjugada con PS como se indica en la gráfica. Los resultados se expresaron como índice de estimulación (IS) = (cpm experimentales/cpm de fondo sin estimular). \*= concentraciones de N19 de 0,312 a 10 µg/ml.

La Figura 16 muestra las respuestas de la proliferación de linfocitos T específicos para el epítipo N19. Se probaron células del bazo de ratones inmunizados dos veces con N19-MenACWY (6 µg de N19/dosis) para la proliferación *in vitro* en presencia de 0,12-30 µM de péptidos individuales (P2TT, P21TT, P23TT, P30TT, HA, HBsAg) y 0,004 a 1 µM de N19 como se indica en la gráfica. Los resultados se expresaron como índice de estimulación (IS) = (cpm experimentales/cpm de fondo sin estimular). \*= concentraciones de N19 de 1 a 0,004 µM.

La Figura 17 muestra la respuesta proliferativa de linfocitos T de cepas congénicas de ratones inmunizados con N19-MenACWY. Las cepas de ratones con diferente haplotipo H-2 se inmunizaron tres veces con N19-MenACWY (6 µg de N19/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio. Las células del bazo se probaron para la proliferación *in vitro* en presencia de 1,7- 15 µM de péptidos N19 (enumerados en la Tabla 1) y 0,1 a 10 µg/ml de proteína N19, libre o conjugada con PS Men. Los resultados se expresaron como índice de estimulación (IS) = (cpm experimentales/cpm de fondo sin estimular). Un IS >2 se consideró positivo.

La Figura 18 muestra la activación de linfocitos T específicos para P23TT, HA y HBsAg. Índices de estimulación para los péptidos homólogos y la proteína N19, como se han determinado en el ensayo de proliferación. Se inmunizaron grupos de tres ratones en la base de la cola con 50 µl de volumen que contenía 50 µg de péptido individual emulsionado 1:1 en CFA. Siete días después se extrajeron los ganglios linfáticos y las células LN se probaron para su capacidad para proliferar en presencia del péptido homólogo o proteína N19 a diferentes concentraciones. Los resultados se obtuvieron en cultivos por triplicado de ratón individual. Los resultados se expresaron como índice de estimulación (IS) calculado a partir de las cpm promedio del grupo experimental/cpm del fondo.

## MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

### 1. Preparación de glicoconjugados

#### 1.1 Expresión y purificación de la proteína de polipeptos N19.

Se cultivaron durante la noche cepas de *E. coli* que llevaban los plásmidos recombinantes pQE-N19 en placas de LB-agar, 100 µg/ml de ampicilina a 37°C. Entonces, las bacterias crecidas se inocularon en 500 ml de medio LB, 100 µg/ml de ampicilina y se hicieron crecer durante la noche a 37°C. Entonces, los 500 ml se diluyeron en 5 l de medio en un fermentador. El crecimiento se ha realizado en condiciones optimizadas. Cuando se obtuvo un valor de DO<sub>600nm</sub> de 4,2, la expresión de la proteína de polipeptos se indujo durante 3,5 horas añadiendo IPTG 1 mM (iso-propil-tio-galactósido) hasta una DO<sub>600nm</sub> de 7,2. Se recogieron dos muestras del sobrenadante de cultivo bacteriano, a tiempo cero antes de añadir IPTG (a DO 4,2) y el momento final de expresión (t<sub>final</sub> DO 7,2). El sedimento obtenido se resuspendió en tampón de muestra y se cargó sobre una SDS al 12,5%-PAGE en dilución seriada correspondiente a diferentes DO de cultivo bacteriano. El cultivo bacteriano completo se centrifugó a 5000 g en un rotor JA10 (Beckman, Fullerton, CA) durante 20 min a 4°C. El sedimento celular obtenido de 60 g se suspendió en 500 ml de tampón de lisis (guanidina-HCl 6 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, TCEP 2 mM (Pierce) a pH 8), se agitó durante 1 h a TA y luego se incubó durante 1 h a 37°C. El sobrenadante que contenía la proteína disuelta se recogió por centrifugación a 12000 rpm en un rotor J20 (Beckman) durante 20 min a TA y se sometió a cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Antes de adsorberse la muestra sobre la columna de IMAC se añadió TCEP 1 mM (clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina, Pierce), que mostró previamente ser esencial durante la purificación para evitar la copurificación de sustancias contaminantes unidas covalentemente a N19 por enlaces disulfuro. El material disuelto se cargó sobre una columna XK50 que contenía 360 ml de Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Suecia) con IDA (ácido iminodiacético) activado con níquel, entonces la columna se lavó con 5 volúmenes de tampón de lisis. Luego se aplicó un gradiente de 300 ml de guanidina-HCl 6 M a pH 8 a urea 8 M a pH 8 que contenía TCEP 1 mM. La columna se lavó con 3 volúmenes de tampón B (urea 8 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7) y las proteínas se eluyeron con 1800 ml de gradiente de imidazol 0-200 mM en tampón B. Las fracciones recogidas de la columna se analizaron cualitativamente en SDS al 12,5%-PAGE (BioRad) y cuantitativamente por el procedimiento de determinación de proteínas de Bradford (ensayo de proteínas BioRad).

Las fracciones de gradiente seleccionadas que contenían las proteínas recombinantes purificadas se sometieron a cromatografía de intercambio catiónico (CEC). Las fracciones reunidas de 600 ml se cargaron en una columna XK50 que contenía 120 ml de resina SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La columna se lavó con 5 volúmenes de tampón C (urea 7 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM a pH 7, β-mercaptoetanol 10 mM) y las proteínas se eluyeron con 1300 ml de gradiente de NaCl 0-500 mM en tampón C. Las fracciones de gradiente que contenían las proteínas recombinantes purificadas, seleccionadas por análisis de SDS al 12,5%-PAGE (BioRad), se reunieron y se dializaron contra NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%. La concentración final de proteína se determinó por el procedimiento micro BCA según las instrucciones del fabricante (Pierce). La proteína se analizó en SDS al 12,5%-PAGE (BioRad). Se ha medido la densidad óptica de las bandas para la evaluación de la integridad (programa informático Image Master 1D Elite v4.00 LabScan). El nivel de endotoxinas en la preparación de proteína final se determinó por el procedimiento turbidimétrico cinético del lisado de amebocito de *Limulus* (LAL) por el Departamento de control de calidad (Chiron Vaccines Siena).

### 1.2 Producción de oligosacáridos

Los polisacáridos meningocócicos del grupo A, C, W, Y se purificaron a partir de cepas de *Neisseria meningitidis* por el procedimiento convencional descrito para la producción de vacunas meningocócicas (291). Entonces, los polisacáridos capsulares purificados se despolimerizaron y se activaron con el fin de acoplarse a la proteína portadora que se ha descrito previamente (292, 293). Brevemente, los inventores describen aquí el procedimiento para la preparación de oligosacáridos meningocócicos del serogrupo C. El polisacárido capsular MenC purificado se sometió a hidrólisis en tampón acetato sódico 10 mM a pH 5,0 para reducir el grado de polimerización (GP) promedio. La reacción se realizó a 80°C durante ~12 h hasta que se alcanzó un GP de 10. El GP puede seguirse en línea durante la hidrólisis analizando el contenido de ácido siálico total en la disolución de polisacárido de partida (constante durante hidrólisis) y el formaldehído liberado del grupo terminal de cada cadena después de la oxidación. La medición del GP en tiempo real permitió la extrapolación del momento final de la hidrólisis. Los oligosacáridos se clasificaron por tamaño por cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF que retuvo los polisacáridos de mayor peso molecular en la columna, mientras que los oligosacáridos de bajo peso molecular (GP <6) se eluyeron de la columna con tampón acetato sódico 5 mM, 100 mM en NaCl, pH 6,5. Entonces, la fracción de oligosacáridos deseada se eluyó con bromuro de tetrabutilamonio 0,7 M (TAB), un contraión positivo, que desplazó los oligosacáridos negativamente cargados de la columna. Entonces, los productos se sometieron a concentración/diafiltración contra agua en una membrana de 3K de corte para eliminar el exceso de TAB y para concentrar el oligosacárido MenC en preparación. Después de la diafiltración, el retentato se secó mediante una etapa de evaporación rotatoria. Después, el oligosacárido MenC se sometió a aminación reductora para dar un oligosacárido con un grupo amino primario terminal. La mezcla de reacción se completó hasta 10% de DMSO, 90% de metanol, acetato de amonio 50 mM y cianoborohidruro de sodio 10 mM y se incubó durante 24 h en un baño de agua tapado a 50°C. Entonces, la mezcla de reacción se sometió a una etapa de evaporación rotatoria para reducir el contenido de metanol de la mezcla de reacción de aminación para evitar la posible interacción con tubos de silicona y membranas de diafiltración a continuación de la etapa de diafiltración. Entonces, los oligosacáridos aminados se purificaron a partir de reactivos (cianoborohidruro, DMSO, metanol) mediante concentración/diafiltración contra 8 volúmenes de NaCl 0,5 M, seguido de 4 volúmenes de NaCl 20 mM. Los oligosacáridos aminados purificados se secaron a vacío en la preparación de la etapa de activación. El oligosacárido MenC se solubilizó en agua seguido de la adición a la mezcla de DMSO. Se añadió trietilamina (TEA) para garantizar la suficiente desprotonación del grupo amino primario del oligosacárido y del éster de di-N-hidroxisuccinimida (bis-NHS) de ácido adípico. La bis-NHS se añadió en exceso molar para favorecer la formación del enlace covalente de un único polímero de oligosacárido por cada molécula de éster de bis-NHS. El oligosacárido activado se precipitó mediante la adición de acetona a la mezcla de reacción, que también se usó para separar los oligosacáridos de DMSO, éster de bis-NHS y TEA. El precipitado se secó a vacío, se pesó y se almacenó a 20°C hasta su uso para la conjugación.

El procedimiento para la purificación de los PS fue básicamente el mismo con modificaciones menores en el tiempo de reacción y la temperatura [294].

### 1.3 Conjugación de N19 a oligosacáridos meningocócicos

Después de la purificación, la clasificación por tamaño y la activación, los oligosacáridos se usaron para la posterior conjugación con proteína N19 [295]. Antes de empezar el experimento de conjugación, los inventores evaluaron preliminarmente la posible adsorción específica de los polisacáridos a la resina activada con Ni. En un experimento de conjugación típico, 343,2 nmol de proteína portadora N19 se disolvieron en guanidinio-HCl a pH 8, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, y se adsorbieron a una resina Sepharose Fast Flow activada con níquel de 5 ml previamente empaquetada (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equilibrada en el mismo tampón. El guanidinio-HCl se eliminó lavando la resina con 50 ml de tampón fosfato 100 mM a pH 7,5 y luego se añadió 1 ml de tampón fosfato 100 mM a pH 7,5 que contenía 6864 nmol de oligosacárido meningocócico activado (MenA, MenC, MenW o MenY) a la columna, recirculando a temperatura ambiente durante 2 h. La columna se lavó con 50 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM a pH 7,5 para eliminar el exceso de oligosacárido sin conjugar. Finalmente, el producto conjugado se eluyó con imidazol 300 mM, pH 7, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y se analizó en SDS al 7,5%-PAGE. Las fracciones seleccionadas que contenían el conjugado se reunieron y se dializaron

5 contra PBS. Los glicoconjugados se analizaron para el contenido de azúcar y de proteína. El contenido de sacárido de conjugados de MenC, MenW y MenY se cuantificó mediante la determinación de ácido siálico (143), mientras que el de conjugado de MenA por determinación cromatográfica de manosamina-1-fosfato (121). El contenido de proteína se midió por el ensayo micro BCA (Pierce, Rockford, IL). El grado de glicosilación se calculó a partir de la relación de azúcar con respecto a proteína en peso. Las vacunas conjugadas basadas en CRM (CRM-MenA, CRM-MenC, CRM-MenW, CRM-MenY) tomadas como referencia en este estudio fueron preparadas por el Departamento de fabricación (Chiron Vaccines Siena).

## 2. Cepas de ratón

10 A menos que se especifique de otro modo se usaron grupos de seis ratones BALB/c hembra de 7 semanas. En otro experimento se usaron cuatro cepas congénicas de ratones hembra de 7 semanas con el siguiente haplotipo H-2: BALB/B (H-2<sup>b</sup>) congénico con BALB/c (H-2<sup>d</sup>) y B10.BR (H-2<sup>k</sup>), B10.D2N (H-2<sup>q</sup>), B10.D1 (H-2<sup>d</sup>) congénico con C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>). Los ratones se compraron de Charles River (Calco, Italia) o de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine).

## 3. Programas y formulaciones de inmunización de ratones

15 Los ratones se inmunizaron subcutáneamente en los días 0, 21 y 35 con conjugados de N19 o CRM con diferentes formulaciones de 0,5 ml de vacuna de conjugado monovalente, bivalente, tetravalente o bi-portador basándose en el contenido de sacárido diluido en tampón NaCl al 0,9% como se especifica más adelante. Se tomaron muestras de suero individuales en los días 1 (pre), 20 (pos - 1), 34 (pos 2) y 45 (pos 3) y se congelaron a -20°C hasta su uso. Se recogieron bazos de ratones inmunizados con conjugados de N19 para la evaluación de la proliferación de linfocitos T como se describe en la sección de respuesta inmunitaria medida por célula.

20

### 3.1 Vacuna de conjugado C meningocócico monovalente

25 Se inmunizaron ratones con cantidades decrecientes de N19-MenC o CRM-MenC (de 2,5 a 0,039 µg de MenC/dosis) en presencia de 0,5 mg de hidróxido de aluminio como adyuvante. Los títulos de anticuerpos se midieron como se detalla más adelante.

30 El conjugado que contenía N19 era más inmunogénico que aquel con CRM (Figura 2). Después de dos inmunizaciones, las construcciones basadas en N19 indujeron anticuerpos de suero dirigidos contra IgG de MenC a títulos significativamente superiores a los inducidos por tres dosis del conjugado CRM-MenC (por ejemplo, pos 2 N19-MenC a 0,625 µg frente a pos 3 CRM-MenC a 0,625 µg [P < 0,01]; pos 2 N19-MenC a 0,156 µg frente a pos 3 CRM-MenC a 0,156 µg [P < 0,05]). Además, después de tres dosis, cantidades inferiores de conjugado de N19 fueron suficientes para inducir anticuerpos dirigidos contra IgG de MenC significativamente superiores a los inducidos por el conjugado CRM-MenC (por ejemplo, N19-MenC a 0,156 µg frente a CRM-MenC a 0,625 µg [P < 0,01]).

35 Dos y tres inmunizaciones con conjugados basados en CRM indujeron fuertes respuestas de anticuerpos dirigidos contra el portador contra CRM incluso a la menor dosis probada (es decir, 0,3 µg e inferior). Por el contrario, la respuesta del anticuerpo específico para N19 siempre fue despreciable y sólo fue detectable (incluso a títulos muy bajos) a la mayor dosis (es decir, 6 µg) (Figura 3). Estos anticuerpos dirigidos contra N19 de bajo título no reconocieron toxoide tetánico en fase sólida. Estos resultados muestran claramente que el fuerte efecto auxiliar del poliepítopo N19 no va acompañado de la inducción de niveles significativos de anticuerpos para sí mismo ni para proteínas nativas.

40

45 Como la inmunidad protectora contra MenC se basa principalmente en anticuerpos bactericidas que destruyen las bacterias en presencia de complemento, se midió la actividad funcional de los anticuerpos inducidos. De acuerdo con los resultados obtenidos en ELISA, la Figura 4 muestra que los conjugados de N19 pueden inducir anticuerpos bactericidas a dosis inmunizantes inferiores a las usadas con conjugados basados en CRM. Es de notar que tras una inmunización a la mayor dosis el conjugado de N19-MenC indujo anticuerpos bactericidas con títulos similares a los inducidos por dos dosis del conjugado de CRM-MenC. Los ratones inmunizados dos veces con menores cantidades de N19-MenC produjeron títulos de anticuerpos bactericidas más altos que aquellos inmunizados con CRM-MenC. Estos ratones inmunizados con CRM-MenC requirieron una tercera dosis para alcanzar títulos de anticuerpos bactericidas comparables a aquellos inducidos por conjugados de N19. Por tanto, N19 mostró que se comportaba como un portador más fuerte que CRM induciendo anticuerpos con actividad funcional sustancial contra MenC después de menos inyecciones con menos dosificación.

50

### 3.2 Vacuna de conjugado AC meningocócico bivalente

55 Se inmunizaron ratones con N19-MenA y N19-MenC por separado y combinados o con CRM-MenA y CRM-MenC por separado y combinados (0,625, 0,156 ó 0,039 µg de cada PS Men/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio como adyuvante. Los títulos de anticuerpos se midieron por ELISA como se describe más adelante.

5 Como se muestra en el panel superior en la Figura 5, administrando conjuntamente conjugados de MenA y MenC que contienen tanto portador de N19 como de CRM, la inmunogenicidad contra MenA iba acompañada como era de esperar de una reducción significativa en comparación con la de conjugados administrados por separado (por ejemplo, a 0,156 µg pos 2 N19-MenA frente a N19-MenAC [P < 0,05]; a 0,625 µg pos 3 N19-MenA frente a N19-MenAC [P < 0,05]; a 0,625 µg frente a pos 2 CRM-MenA frente a CRM-MenAC [P < 0,05]; a 0,156 µg frente a pos 3 CRM-MenA frente a CRM-MenAC [P < 0,05]). Sin embargo, ambas formulaciones bivalentes que contenían tanto portador de N19 como de CRM indujeron títulos de anticuerpos comparables (no estadísticamente diferentes) contra MenA después de dos y tres inmunizaciones. El portador de N19 en vacunas conjugadas mono y bivalentes pudo inducir una respuesta de anticuerpos más rápida contra MenA, provocando una respuesta de anticuerpos ya después de la primera dosis, mientras que los conjugados de CRM no indujeron ningún título de anticuerpos medible. Por tanto, después de dos inyecciones de conjugados de N19, la tendencia fue provocar una mayor respuesta de anticuerpos que los conjugados de CRM, pero las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo a la dosificación administrada más baja de la vacuna monovalente (por ejemplo, a 0,039 µg pos 2 N19-MenA frente a CRM-MenA [P < 0,05]).

10 Cuando se midió la respuesta del anticuerpo dirigido contra MenC (panel inferior en la Figura 5) no se observó disminución de los títulos después de dos o tres dosis cuando se compararon las formulaciones monovalentes y bivalentes. Después de una administración disminuyendo la dosificación inmunizante de vacuna monovalente, los niveles de anticuerpos dirigidos contra MenC obtenidos con conjugados de CRM se cancelaron, mientras que aquellos obtenidos con conjugados de N19 se mantuvieron estables. Comparando títulos obtenidos después de una inmunización con las vacunas bivalentes, los conjugados de CRM mostraron ser incapaces de provocar una respuesta sustancial de anticuerpos dirigidos contra MenC, mientras que los conjugados de N19 indujeron mayores niveles con un comportamiento de dosis-respuesta.

15 *3.3 Vacuna de conjugado ACWY meningocócico tetravalente*

25 Las formulaciones tetravalentes se prepararon mezclando juntos en cantidad equivalente de sacárido N19-MenA, N19-MenC, N19-MenW y N19-MenY (N19-MenACWY). Como referencia, los inventores usaron lotes de calidad clínica de vacuna de conjugado CRM (Chiron Vaccines, Siena) formuladas antes de su uso mezclando CRM-MenCWY líquido con CRM-MenA liofilizado. Los ratones recibieron cantidades decrecientes de formulaciones tetravalentes (de 2 µg a 0,074 µg de cada PS Men/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio como adyuvante.

30 La Figura 6 muestra para cualquiera de los cuatro polisacáridos capsulares de serogrupos y a todas las dosificaciones administradas que dos o tres inmunizaciones con N19-MenACWY produjeron títulos de IgG similares. Cuando se compararon las respuestas de anticuerpos con los conjugados de CRM después de tres inmunizaciones y aquellas con conjugados de N19 después de sólo dos inmunizaciones no se encontraron diferencias significativas para los cuatro serogrupos. Después de la segunda dosis, los títulos de anticuerpos contra los serogrupos A y C cuando se conjugaron con N19 fueron significativamente mayores en comparación con aquellos obtenidos cuando se conjugaron con CRM (dirigido contra IgG de MenA y dirigido contra IgG de MenC: pos 2 a todas las dosificaciones administradas de N19 frente a CRM: P < 0,05).

35 Los conjugados de N19 indujeron la producción de anticuerpos contra los cuatro polisacáridos después de la inmunización primaria, pero no los conjugados de CRM. En particular contra MenC, como se muestra en el panel B de la Figura 6, se obtuvieron títulos de anticuerpos significativamente mayores con conjugados de N19 a todas las dosificaciones administradas (pos 1 a todas las dosificaciones administradas de N19 frente a CRM: [P < 0,05]). Los títulos contra MenA y MenW mostrados en el panel A y C fueron significativamente superiores a la mayor dosificación cuando los conjugados de N19 se administraron de una vez (a 2 µg pos 1 N19 frente a CRM: [P < 0,05]). Los anticuerpos inducidos mediante ambos conjugados fueron predominantemente IgG1 (datos no mostrados). Y, lo que es más importante, los inventores observaron que el número de ratones que respondían al tratamiento fue mayor cuando se inmunizó con conjugados de N19 que con conjugados de CRM, especialmente después de la primera y la segunda dosis, mientras que después de la tercera dosis respondieron todos los ratones (Tabla 2).

50 Tabla 2: Porcentaje de ratones que responden al tratamiento a los cuatro antígenos PS (MenACWY) de cada grupo.

Dosis de PS	% de ratones que responden al tratamiento a PS							
	MenA		MenC		MenW		MenY	
	Pos 1							
	N19	CRM	N19	CRM	N19	CRM	N19	CRM
2 µg	83	0	100	0	83	0	100	33

	% de ratones que responden al tratamiento a PS							
	MenA		MenC		MenW		MenY	
0,67 µg	67	17	100	0	67	17	100	17
0,22 µg	17	0	83	0	50	0	50	33
0,074 µg	0	0	83	0	0	17	67	17
	Pos 2							
	N19	CRM	N19	CRM	N19	CRM	N19	CRM
2 µg	100	67	100	100	100	83	100	100
0,67 µg	100	50	100	83	100	83	100	83
0,22 µg	100	83	100	100	100	100	100	100
0,074 µg	100	33	100	67	100	83	100	100
	Pos 3							
	N19	CRM	N19	CRM	N19	CRM	N19	CRM
2 µg	100	83	100	100	100	83	100	100
0,67 µg	100	83	100	83	100	67	100	83
0,22 µg	100	100	100	100	100	100	100	100
0,074 µg	83	100	100	100	100	67	100	100

5 N19-MenACWY fue altamente eficaz en la inducción de anticuerpos bactericidas contra los cuatro polisacáridos Men. En particular, títulos bactericidas contra el grupo C fueron significativamente mayores a todas las dosificaciones administradas después de dos dosis de conjugados de N19 que de conjugados de CRM. La potencia del portador de N19 se puso de relieve realizando un aumento de dosis, ya que limitando la dosis los conjugados de N19 indujeron mayores títulos de anticuerpos bactericidas contra los cuatro polisacáridos que aquellos inducidos por conjugados de CRM. En particular se analizaron los títulos bactericidas contra MenC y MenW en sueros individuales de ratones inmunizados con la dosis más baja (0,074 µg). La Figura 7 muestra que, al igual que para los títulos de ELISA, los títulos de anticuerpos bactericidas de suero (SBA) obtenidos con conjugados de N19 también fueron comparables después de dos o tres dosis. Los títulos bactericidas contra MenC ya fueron significativamente mayores después de dos inmunizaciones con conjugados de N19 que aquellos obtenidos después de tres inyecciones de conjugados de CRM (SBA dirigido contra MenC: pos 2 N19 frente a pos 3 CRM: [P < 0,05]). Comparando títulos bactericidas contra MenW después de dos dosis o después de tres obtenidos tanto con conjugados basados en N19 como con conjugados basados en CRM, los inventores encontraron que los conjugados de N19 indujeron títulos significativamente mayores de anticuerpo bactericida (SBA dirigido contra MenW pos 2 N19 frente a CRM: [P < 0,05]; pos 3 N19 frente a CRM: [P < 0,05]).

20 Se realizó un análisis detallado de la actividad funcional de anticuerpos del grupo A y C usando un ensayo de unión a antígeno modificado que sólo mide anticuerpos de alta afinidad [296]. Los resultados muestran en la Figura 8 que los anticuerpos obtenidos contra MenC con 2 µg de conjugados de N19 ya fueron de alta afinidad después de una dosis. Dos inmunizaciones fueron suficientes para inducir una eficiente maduración de la afinidad de casi todos los anticuerpos. Los otros grupos, inmunizados tanto con menores cantidades de conjugados de N19 como con conjugados de CRM, mostraron un perfil de maduración similar, con un aumento desde el nivel inicial hasta aproximadamente el 50% de los anticuerpos de alta afinidad sólo después de dos dosis (por simplificación sólo se muestran grupos inmunizados con las mayores y las menores dosificaciones).

25 Para evaluar la influencia de la proteína portadora compartida por cuatro polisacáridos para inducir anticuerpos contra sí mismo, los inventores midieron anticuerpos contra ambas proteínas portadoras empleadas (Figura 9). Además, los inventores analizaron si los anticuerpos producidos contra los portadores

también podían unirse a proteínas parentales. La Figura 9 muestra en el panel A que los anticuerpos producidos con conjugados de CRM reconocieron igualmente de bien DT, la proteína parental de CRM. Por el contrario, los anticuerpos para conjugados de N19 no reaccionaron de forma cruzada con sus proteínas parentales tales como toxoide tetánico (TT) y hemaglutinina de la gripe (HA), de los que se derivan los epítopes de N19. Debe observarse que diez epítopes (cinco repetidos dos veces) de TT están contenidos en N19, representando más del 50% de su secuencia.

### 3.4 Vacuna de conjugado ACWY meningocócico tetravalente de bi-portador

Las formulaciones tetravalentes se prepararon mezclando juntos MenA conjugado tanto con N19 como con CRM con MenCWX conjugado tanto con CRM como con N19 (N19-MenA+CRM-MenCWX y viceversa, CRM-MenA+ N19-MenCWX). Los grupos de control recibieron formulaciones tetravalentes que contenía un portador (N19-MenACWX o CRM-MenACWX). Los ratones recibieron cantidades decrecientes de formulaciones tetravalentes (de 0,67 µg a 0,074 µg de cada polisacárido Men/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato de aluminio como adyuvante. Los títulos de anticuerpos se determinaron usando los procedimientos descritos más adelante.

Los N19-MenACWX produjeron después de la primera dosis títulos dirigidos contra IgG de MenA comparables a los obtenidos después de dos dosis de vacuna basada en CRM (Figura 6). Además, los ratones inmunizados dos veces con conjugados de N19 provocaron títulos bactericidas significativamente mayores contra MenA que aquellos inmunizados con conjugados de CRM (Figura 10). Los inventores observaron que cuando se administró N19-MenA simultáneamente con CRM-MenCWX o viceversa intercambiando el portador en MenA, la respuesta del anticuerpo aumentó significativamente en comparación con la formulación tetravalente que contenía un único portador (por ejemplo, pos 2 a 0,67 µg: N19-MenA+CRM-MenCWX frente a N19-MenACWX: [P <0,05]; pos 3 a 0,67 µg: N19-MenA+ CRM-MenCWX frente a CRM-MenACWX: [P <0,01]; pos 2 a 0,22 µg: CRM-MenA+N19-MenCWX frente a CRM-MenACWX: [P <0,001]). Sin embargo, los inventores observaron que reduciendo la dosificación inmunizante de ambas formulaciones de bi-portador, los anticuerpos dirigidos contra MenA disminuyeron significativamente en el título de IgG, pero no en su título bactericida ni después de dos ni después de tres inmunizaciones (Figura 10). Además, ambas vacunas de bi-portador indujeron títulos bactericidas comparables a todas las dosificaciones (Figura 11). Es de notar que la presencia de N19 en todas las formulaciones provocó consecuentemente una respuesta de anticuerpos después de sólo una inmunización, pero no CRM solo (Figura 10).

### 3.5 Cepas de ratón con diferentes antecedentes genéticos

En un experimento preliminar, dos grupos de ratones BALB/c y C57BL/6 se inmunizaron dos veces con 0,67 ó 0,22 µg de N19-MenACWX o CRM-MenACWX con 0,06 mg de fosfato de aluminio. En otro experimento, cepas congénicas de ratones se inmunizaron tres veces con formulaciones tetravalentes N19-MenACWX o CRM-MenACWX (0,67 µg de cada polisacárido Men/dosis) en presencia de 0,06 mg de fosfato preparado como se ha descrito anteriormente. Se usaron ratones BALB/c como control.

Basándose en los resultados anteriormente obtenidos en ratones BALB/c, los inventores decidieron inmunizar ratones sólo dos veces con dos dosificaciones diferentes de formulaciones tetravalentes que contenían N19 o CRM y se midieron las respuestas de anticuerpos contra los cuatro polisacáridos (Figura 12). Se demostró de nuevo en ratones BALB/c que N19 se comportó como un portador más fuerte que CRM en la vacuna tetravalente, en particular en la inducción de anticuerpos dirigidos contra MenA (BALB/c 0,22 µg pos 2 N19 frente a CRM: [P<0,001]). Los inventores observaron que ambos conjugados que contenían tanto N19 como CRM fueron menos inmunogénicos en ratones C57BL/6 que en ratones BALB/c, y las respuestas de anticuerpos fueron más variables. Además, el mejor efecto de portador de N19 fue menos evidente contra los cuatro polisacáridos que el observado en BALB/c. Sin embargo, los conjugados de N19 pudieron provocar coherentemente títulos de anticuerpos contra los cuatro polisacáridos ya después de la primera inmunización, pero no los conjugados de CRM.

Como se muestra en la Figura 13, los conjugados de N19 y de CRM fueron más inmunogénicos contra los cuatro conjugados en cepas BALB/c H-2<sup>d</sup> y B10.D1 H-2<sup>q</sup>. En general, más ratones respondieron cuando se inmunizaron con conjugados basados en N19 que con conjugados basados en CRM. B10.D2N H-2<sup>d</sup> con el mismo haplotipo que los ratones BALB/c fueron mejores receptores para conjugados de N19 que para conjugados de CRM. Por una parte, BALBB H-2<sup>b</sup> congénicos con ratones BALB/c fueron mejores receptores para conjugados de CRM que para conjugados de N19. Por otra parte, los conjugados de CRM no provocaron ninguna respuesta de anticuerpos contra ninguno de los cuatro polisacáridos en B10.BR H-2<sup>k</sup>, pero sí los conjugados de N19. Sorprendentemente, los conjugados de N19 provocaron respuestas de anticuerpos sustanciales después de la primera dosis en todas las cepas de ratón probadas contra los cuatro polisacáridos con pocas excepciones en las cepas menos inmunogénicas. La mayoría de los ratones de diferentes antecedentes genéticos usados en este estudio produjo anticuerpos para los cuatro polisacáridos, que indica una falta de restricción genética aparente de respuesta inmunitaria tras la inmunización con conjugados de N19.

Como se muestra en la Figura 14, de acuerdo con las respuestas de IgG medidas por ELISA, títulos

bactericidas obtenidos con conjugados de N19 y de CRM también fueron mayores en receptores BALB/c H-2<sup>d</sup>. Los inventores observaron que conjugados de N19 indujeron mayores títulos bactericidas que conjugados de CRM contra los cuatro polisacáridos en todas las cepas probadas, excepto en ratones BALB/B contra MenA. La evaluación de la actividad funcional de los anticuerpos producidos por el ensayo bactericida de suero confirmó además el mejor efecto de portador de N19 en comparación con CRM.

#### 4. Protocolos de ensayo inmunológico de adsorción (ELISA)

##### 4.1 IgG específica para polisacáridos meningocócicos del serogrupo A, C, W-135 y Y

La valoración de inmunoglobulinas G (IgG) específicas para MenA, MenC, MenW y MenY se realizó en sueros individuales de cada ratón según los ensayos ya descritos [297]. Se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos Nunc Maxisorp durante la noche a 4°C por separado con 5 µg/ml de polisacáridos purificados del serogrupo A, C, W o Y de *N. meningitidis* en presencia de 5 µg/ml de albúmina de suero humano metilada. Las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,33% de Brij-35 (PBS-Brij), luego se saturaron con 200 µl/pocillo de PBS que contenía SBF al 5% y 0,33% de Brij-35 (PBS-FCS-Brij) durante 1 h a TA. Los sueros individuales se diluyeron en PBS-FCS-Brij y se valoraron contra los cuatro polisacáridos por separado. Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Al siguiente día, las placas se lavaron con PBS-Brij, se añadió anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., SA Louis, Mo.) diluido en PBS-FCS-Brij y las placas se incubaron 2 horas a 37°C. Los anticuerpos unidos se revelaron usando 1 mg/ml de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma Chemical Co., SA Louis, Mo.) en disolución de dietanolamina. Después de 20 min de incubación, la absorbancia se leyó a 405 nm. Los valores de preinmunización dieron consistentemente un valor de DO inferior a 0,1. Los resultados se expresaron como títulos con respecto a un suero de referencia propio mediante análisis en línea paralelo para minimizar la variación de placa a placa. Los títulos de IgG se calcularon usando el ensayo en línea de referencia [298] y se expresaron como el logaritmo de UE/ml.

##### 4.2 IgG1/IgG2a de isotipo específicas para polisacáridos meningocócicos del serogrupo A y C

Para medir anticuerpos dirigidos contra IgG1 y IgG2a específicas para MenA y MenC, las placas se recubrieron durante la noche a 4°C con 5 µg de albúmina de suero humano metilada/ml y 5 µg de MenA o MenC purificado por ml en PBS como se ha descrito anteriormente para ELISA de IgG. Entonces, las placas se lavaron y se bloquearon con PBS-FCS-Brij durante 1 h a TA. Las muestras de suero se diluyeron en PBS-FCS-Brij a través de dos placas en paralelo a partir de 1:100 y se incubaron durante 2 h a 37°C. Se añadieron anticuerpos de cabra dirigidos contra IgG1 o IgG2a de ratón conjugada con biotina (Southern Biotechnology Associates, Inc.). Después de 2 h de incubación a 37°C se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (DAKO) a los pocillos y las placas se incubaron durante 1 h a 37°C. Las placas se revelaron con el sustrato diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma). Los títulos se calcularon como el recíproco de la dilución de suero a la que la DO es 0,5 (450 nm).

##### 4.3 Anticuerpos IgG específicos para N19, TT, HA o CRM, DT.

La valoración de proteínas portadoras N19, CRM197 y sus proteínas parentales, en este documento el toxoide tetánico (TT), *Haemophilus influenzae* (HA) y toxoide diftérico (DT), se realizó en sueros reunidos como se ha descrito previamente [299, 300]. Brevemente, placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) se recubrieron durante la noche a 4°C con 200 µl de una disolución de PBS que contenía por separado 2 µg/ml de N19, TT, HA o CRM197 o 5 µg/ml de antígeno de DT. Entonces, las placas se lavaron y se bloquearon con PBS-BSA al 1% durante 1 h a 37°C. Las muestras de suero se diluyeron en PBS-BSA al 1%-Tween 20 al 0,05% a lo largo de la placa a partir de 1:100 y se incubaron durante 2 h a 37°C. Para la detección se usaron anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con fosfatasa alcalina y fosfato de p-nitrofenilo. La presencia de anticuerpos específicos para antígeno se reveló como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresaron como títulos con respecto a un suero de referencia propio mediante análisis en línea paralelo para minimizar la variación de placa a placa.

##### 4.4 Afinidad de anticuerpos IgG meningocócicos del serogrupo A y C.

La afinidad de anticuerpos IgG meningocócicos específicos para el grupo A y C se evaluó por el ensayo de elución de ELISA de sueros reunidos usando 75 mM de tiocianato de amonio [NH<sub>4</sub>SCN] como agente caotrópico según el procedimiento bien establecido [301, 302]. La validación del ensayo incluyó la evaluación de la estabilidad del antígeno tras la incubación con NH<sub>4</sub>SCN 4 M [303]. Se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos Nunc Maxisorp durante la noche a 4°C con 5 µg/ml de polisacáridos purificados del serogrupo A y C de *N. meningitidis* por separado. La disolución se aspiró y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Brij y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (PBS-FCS-Brij). Las placas se lavaron con tampón de lavado (PBS-Brij). Los sueros de prueba y de referencia se diluyeron en tampón de dilución PBS-FCS-Brij y se prepararon diluciones dobles seriadas por duplicado en una microplaca. Después de 2 h de incubación a 37°C, las placas se lavaron tres veces. Las muestras de suero en uno de los duplicados se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente con NH<sub>4</sub>SCN 75 mM en tampón de dilución de suero PBS-FCS-Brij, mientras que el otro duplicado se incubó con tampón de dilución solo. Después de lavar, las placas se incubaron con anticuerpos de cabra dirigidos contra IgG de ratón conjugada

con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., SA Louis, Mo.) como en el ensayo de ELISA anteriormente mencionado. La cantidad de anticuerpos restante unida a la placa después de la elución con  $\text{NH}_4\text{SCN}$  75 mM se calculó en unidades de ELISA mediante referencia a curvas de ELISA patrón correspondientes al 100% de anticuerpos unidos. Los títulos de IgG de alta afinidad se representaron en % de anticuerpos unidos en función del tiempo.

### 5. Ensayo bactericida de suero contra cepas A, C, W y Y meningocócicas

El procedimiento usado para la medición de títulos de anticuerpos bactericidas se ha descrito previamente (94). Se cultivaron las cepas diana del serogrupo A (cepa F8238), C (cepa 11), W (cepa 240070) o Y (cepa 240539) de *N. meningitidis* durante la noche a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  en placas de agar de chocolate (a partir de un material congelado). Las colonias con una absorbancia de 0,05-0,1 a 600 nm se suspendieron en 7 ml de caldo Mueller-Hinton que contenía glucosa al 0,25% y se incubaron agitando durante 1,5 horas a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$  para alcanzar una absorbancia de ~ 0,24-0,4 a 600 nm. Las suspensiones celulares bacterianas se diluyeron en tampón GBSS (solución salina equilibrada con Gey) (SIGMA) y BSA al 1% (tampón de ensayo) para dar aproximadamente  $10^5$  UFC/ml. Las muestras de suero individuales o reunidas inactivadas con calor (56 °C durante 30 min) (50  $\mu\text{l}$ ) se diluyeron seriadamente dos veces (dilución inicial recíproca de 4) en tampón en placas de fondo plano de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido (Costar, Inc., Cambridge, Mass.). Se mezclaron cuidadosamente volúmenes iguales de suspensiones de células y complemento de conejo bebé reunido (25%) y se añadieron 25  $\mu\text{l}$  a sueros seriadamente diluidos. El volumen final en cada pocillo fue 50  $\mu\text{l}$ . Los controles incluyeron (i) tampón de complemento de bacteria (control dependiente del complemento) y (ii) tampón de suero de bacteria de prueba inactivado con calor (control independiente del complemento). Inmediatamente después de la adición del complemento de conejo bebé, 10  $\mu\text{l}$  de los controles se sembraron en placas de agar Mueller-Hinton por el procedimiento de basculación (tiempo cero,  $t_0$ ). Las placas de microtitulación se incubaron para todos los serogrupos de las cepas diana a 37°C durante 1 h con 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de la incubación, 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra se sembraron en placas de agar Mueller-Hinton como puntos, mientras que 10  $\mu\text{l}$  de los controles se sembraron por el procedimiento de basculación (tiempo uno,  $t_1$ ). Las placas de agar se incubaron durante 18 h a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ , y las colonias correspondientes a  $t_0$  y  $t_1$  se contaron. Las colonias a  $t_1$  fueron un control de toxicidad eventual del complemento o el suero y tiene que ser 1,5 veces las colonias a  $t_0$ . Los títulos bactericidas se expresaron como la dilución de suero recíproca dando  $\geq 50\%$  de destrucción en comparación con el número de células diana presentes antes de la incubación con suero y complemento ( $t_0$ ). Los títulos se consideraron fidedignos si al menos las dos diluciones siguientes dieron  $\geq 90\%$  de la destrucción bacteriana.

Se usó la prueba de la *t* de Student (2 colas) para comparar títulos de anticuerpos entre grupos y a diferentes tiempos. Un valor de *P* de  $< 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo.

### 6. Respuestas inmunitarias mediadas por célula

#### 6.1 Ensayo de proliferación *in vitro* con epítopes de N19, N19 o conjugados de N19 de ratones BALBc cebados con N19-MenACWY.

Para evaluar si la inmunización con conjugados de N19 cebaron o no linfocitos T específicos para epítopes de portador, los bazos de ratones inmunizados dos o tres veces con N19-MenACWY tetravalente (~6 ó 2  $\mu\text{g}$  de proteína/dosis) como se ha descrito anteriormente se extirparon 10 días después de la última inmunización y se probaron para su capacidad para proliferar tras la estimulación *in vitro* con péptidos individuales constituidos por N19 o N19 libre o conjugado [304]. El N19 purificado empleado en este ensayo no contenía LPS detectable, que posiblemente habría podido interferir. Los bazos de cada grupo de ratón se reunieron y se dispersaron manualmente. Una vez lavadas y contadas, las células se cultivaron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células por pocillo en RPMI (GIBCO BRL Life Technologies) complementado con tampón HEPES 25 mM, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina, 2-mercaptoetanol 50  $\mu\text{M}$ , L-glutamina 0,15 mM, piruvato de sodio, vitaminas, piruvato de sodio y una mezcla de aminoácidos no esenciales (GIBCO BRL Life Technologies 1% de 100 x disolución madre) y suero bovino fetal al 5% (Hyclone) en placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano (Corning NY). Las células se cultivaron por triplicado en presencia de los péptidos individuales de 0,12 a 30  $\mu\text{M}$  por pocillo (diluciones de dos o tres veces) (~ 0,15 - 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o se añadió N19 libre o conjugado de 0,004 a 1  $\mu\text{M}$  diluido en el mismo medio a los pocillos por triplicado para dar un total de 200  $\mu\text{l}$  por pocillo. Los controles se ejecutaron con medio de cultivo completo o 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de concanavalina A para demostrar la capacidad proliferativa de las células. Las placas se incubaron a 37°C en 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de cinco días, las células se pulsaron con 0,5  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina (Amersham Biosciences 1 mCi/ ml de disolución madre) por pocillo durante 18 h adicionales y se recogieron con el colector Filtermate y se contaron en un contador de centelleo líquido (Packard Bioscience). Los resultados de ensayos proliferativos se expresaron como el índice de estimulación (IS) calculado mediante la relación de recuentos por minuto (cpm) en cultivos experimentales con el estímulo con respecto a recuentos por minuto de cultivos de control (fondo) sin estímulo. Los triplicados de cultivos se ejecutaron en paralelo. Un IS  $> 2$  se consideró positivo.

Para determinar si el fuerte efecto de los linfocitos T auxiliares de N19 en el sistema de ratón estaba mediado por alguno de los epítopes  $\text{CD4}^+$  originalmente incluidos en N19 se evaluó la proliferación de

linfocitos T de esplenocitos de ratones BALB/c cebados dos o tres veces con N19-MenACWY (6 µg de N19/dosis). Se estimularon células del bazo *in vitro* con diferentes concentraciones de péptidos de N19 o con N19 completo, tanto libre como conjugado con los polisacáridos. Como se muestra en la Figura 15, los linfocitos proliferaron sustancialmente en presencia de N19 libre o conjugado. Los inventores también observaron consistentemente la proliferación de linfocitos T con péptido P23TT en todos sus experimentos (Figuras 15 y 16). Dentro de los otros péptidos probados, los inventores observaron una proliferación de linfocitos T inducida por P30TT, P32TT, HA y HBsAg, incluso sólo en presencia de concentraciones mayores. Cuando los ensayos se llevaron a cabo con ratones C57BL/6, ninguno de los epítopes estimuló la proliferación de linfocitos y N19 estimuló células sólo a la mayor concentración.

Además, los inventores midieron la activación de linfocitos T específicos para N19 en cepas congénicas de ratones para investigar si había algún patrón de restricción del MHC. La activación se analizó *in vitro* midiendo respuestas proliferativas de células del bazo de ratones con diferentes antecedentes genéticos en presencia de diferentes concentraciones de N19 tanto 1) libre como 2) conjugado con los polisacáridos, o con 3) N19 individuales que constituyen péptidos o con 4) componentes de polisacárido libres. Los inventores observaron que N19 libre indujo la activación de linfocitos T en todas cepas, pero los conjugados de N19 produjeron respuestas proliferativas diferenciales en las cepas probadas (Figura 17). Evaluando la influencia de los genes de fondo (BALB o B10) sobre respuestas H-2, los inventores observaron que ratones de haplotipo H-2<sup>d</sup> generaron linfocitos T específicos para diferentes epítopes. Se generó una memoria de linfocitos T del epítope P23TT en dos ratones genéticamente sin relacionar (BALB/c H-2<sup>d</sup> y B10.BR H-2<sup>k</sup>). Por otra parte, ratones congénicos (BALB o B10) con diferentes haplotipos H-2 generaron diferente proliferación de linfocitos T específicos para epítopes sugiriendo que los factores genéticos fuera del complejo MHC también influyen en la respuesta. Sin embargo, los ratones con los mismos antecedentes genéticos (BALB) generaron linfocitos T reactivos para el epítope P30TT. En conjunto, a pesar del hecho de que los péptidos se diferenciaron en su nivel de restricción de H-2, todas las cepas pudieron organizar una buena respuesta de anticuerpos contra los cuatro polisacáridos con conjugados de N19. Además, los inventores observaron que cualquiera de los cuatro polisacáridos podía inducir una proliferación en cualquier cepa probada, que indica que son antígeno independiente de linfocitos T y la conjugación con una proteína portadora no interfiere con sus características tales como la capacidad para inducir activación de linfocitos T específicos para polisacáridos.

#### 6.2 Evaluación de la proliferación de linfocitos T murinos específicos para epítopes: protocolo de inmunización y ensayo de proliferación.

Se compraron péptidos sintéticos (P2TT, P21TT, P23TT, P30TT, P32TT, HA y HBsAg) con 95% de pureza de Primm s.r.l. (Italia). Se inmunizaron subcutáneamente grupos de tres ratones BALB/c en la base de la cola con 50 µl de volumen por ratón que contenía 50 µg de un único péptido (P2TT, P30TT, P23TT, P32TT, HA, HBsAg) o N19 emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA). Siete días después, los ratones se sacrificaron, se extirparon los ganglios linfáticos inguinales y periaórticos y se reunieron de ratones dentro de cada grupo, y se preparó una única suspensión de células. Las células se cultivaron a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por pocillo en medio completo (RPMI complementado como se ha descrito anteriormente para las células del bazo) en placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano (Costar Corp., Cambridge, Mass.). Se añadieron N19 o péptido homólogo diluido en el mismo medio a pocillos por triplicado de células cultivadas de ratón individuales o reunidas a tres concentraciones diferentes (15, 7,5 y 3,75 mM de todos los péptidos y 10, 1 y 0,1 µg/ml de N19). Después de cinco días de incubación a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, las células se pulsaron con 0,5 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina durante 16 h y luego se recogieron como se ha descrito anteriormente. En estos experimentos se emplea como control negativo un péptido no relacionado CH60 (predicho por ordenador que se une a HLA-A2) derivado de la proteína de superficie de *Chlamydia pneumoniae*.

La Figura 18 muestra que la inmunización de ratones BALB/c con péptidos individuales produjo respuestas de linfocitos T específicos para los péptidos P23TT, HA, HBsAg y N19, pero no para el péptido CH60 sin relacionar. Los ratones inmunizados con P32TT fallaron en responder al mismo péptido. Las células de ratones de control auxiliares proliferaron en respuesta a ConA, pero no en respuesta a ningún péptido ni a N19, demostrándose así que los péptidos no eran mitogénicos. A pesar de ser epítopes humanos, estos hallazgos también pueden explicar el fuerte efecto del portador de N19 en el sistema de ratón.

Se entenderá que la invención sólo se ha descrito a modo de ejemplo y pueden hacerse modificaciones mientras se encuentren dentro del alcance de la invención.

## REFERENCIAS

- [1] Armand y col. (1982) J. Biol. Stand 10:335-339.
- [2] Cadoz y col. (1985) Vaccine 3:340-342.
- [3] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [4] Peltola (2000) Clin Microbiol Rev 13:302-317

- [5] Wuorimaa & Kayhty (2002) Scand J Immunol 56:111-129
- [6] Balmer y col. (2002) J Med Microbiol 51:717-722
- [7] Del Giudice (1992) Curr Opin Immunol 4:454-459
- [8] Eltinger (1990) Science 249:423-425
- 5 [9] Alexander y col. (2000) J Immunol 164:1625-1633
- [10] WO99/55730
- [11] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824
- [12] Demotz, S. y col. (1993) Eur J Immunol 23:425-32.
- [13] Ho, P. C. y col. (1990) Eur J Immunol 20:477-83.
- 10 [14] Sinigaglia, F. y col. (1988) Nature 336:778-80.
- [15] Panina-Bordignon, P. y col. (1989) Eur J Immunol 19:2237-42.
- [16] O'Sullivan, D. y col. (1991) J Immunol 147:2663-9.
- [17] Falugi, F. y col. (2001) Eur. J Immunol. 31:3816-24.
- [18] Greenstein, J. L. y col. (1992) J Immunol 148:3970-7.
- 15 [19] Rothbard, J. B. y col. (1988) Cell 52:515-23.
- [20] WO02/3477
- [21] WO03/093306
- [22] WO04/041157
- [23] WO2005002619
- 20 [24] PCT/IB2004/003366
- [25] WO03/007985
- [26] Vaccine (ed Plotkin y col) Fourth Edition ISBN 0- 7216- 9688-0
- [27] Wessels y col. (1990) J Clin Invest 86:1428-33.
- [28] Wessels y col. (1989) Infect Immun 57:1089-94.
- 25 [29] WO03/080678
- [30] Ravenscroft y col. (1999) Vaccine 17:2802-2816.
- [31] Costantino y col. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- [32] Lei y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.
- [33] WO00/38711; patente de EE.UU. 6.146.902.
- 30 [34] Lees y col. (1996) Vaccine 14:190-198.
- [35] WO95/08348.
- [36 ] WO98/4272
- [37] Patente de EE.UU. 4.882.317
- [38] Patente de EE.UU. 4.695.624
- 35 [39] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [40] EP-A-0208375
- [41] WO00/10599

- [42] Gevertz y col., *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).
- [43] Patente de EE.UU. 4.057.685.
- [44] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [45] Patente de EE.UU. 4.459.286.
- 5 [46] Patente de EE.UU. 4.965.338
- [47] Patente de EE.UU. 4.663.160.
- [48] Patente de EE.UU. 4.761.283
- [49] Patente de EE.UU. 4.356.170
- [50] Lei y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- 10 [51] WO00/38711; patente de EE.UU. 6.146.902.
- [52] WO99/24578
- [53] WO99/36544
- [54] WO99/57280
- [55] WO00/22430.
- 15 [56] Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815
- [57] WO96/29412
- [58] Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820
- [59] WO01/52885
- [60] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-96
- 20 [61] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [62] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [63] Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [64] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [65] WO03/007985.
- 25 [66] WO00/66791
- [67] WO01/649
- [68] WO01/649
- [69] WO03/020756
- [70] WO2004/032958
- 30 [71] WO2004/048404.
- [72] WO98/18931
- [73] WO98/18930
- [74] Patente de EE.UU. 6.699.703
- [75] Patente de EE.UU. 6.800.744
- 35 [76] WO97/4330
- [77] WO97/37026
- [78] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.

- [79] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [80] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [81] WO02/22167.
- [82] Paoletti y col., (1990) *J Biol Chem* 265:18278-83.
- 5 [83] Wessels y col., (1990) *J Clin Invest* 86:1428-33.
- [84] Baker y col., (2004) *J Infect Dis* 171:879-84.
- [85] WO02/34771
- [86] WO2005/032582
- [87] WO02/094851
- 10 [88] Dale, *Vaccine* (1999) 17:193-200
- [89] Dale, *Vaccine* 14(10): 944-948
- [90] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [91] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [92] WO02/18595
- 15 [93] WO99/58562
- [94] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [95] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med* 334:349-355.
- [96] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [97] Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219.
- 20 [98] WO00/56360
- [99] *Infect Immun.* 2001 May; 69(5): 3510-3515
- [100] WO03/093306
- [101] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6
- [102] WO2004/041157
- 25 [103] WO2005/002619
- [104] Zhu y col., *Vaccine* (2004) 22:660 - 669
- [105] Price y col., *Infection and Immunity* (2004) 71(1):277-283)
- [106] Plante y col., *J Infectious Disease* (2000) 182:848 - 855)
- [107] WO02/079243
- 30 [108] WO00/37494
- [109] WO03/049762
- [110] WO031068811
- [111] WO99/28475.
- [112] Patente de EE.UU. 6.756.361
- 35 [113] Covacci & Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- [114] WO93/18150.
- [115] WO99/53310

- [116] Covacci y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5791-5795.
- [117] Tummuru y col. (1994) Infect. Immun. 61:1799-1809.
- [118] Marchetti y col. (1998) Vaccine 16:33-37.
- [119] Telford y col. (1994) J. Exp. Med. 179:1653-1658.
- 5 [120] Evans y col. (1995) Gene 153:123-127.
- [121] WO96/01272 & WO96/01273, especially SEC ID NO:6.
- [122] WO97/25429.
- [123] WO98/04702.
- [124] Infect Immun. 2002 August; 70(8):4414
- 10 [125] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39:85-100.
- [126] Demicheli y col. (1998) Vaccine 16:880-884.
- [127] Stepanov y col. (1996) J Biotechnol 44:155-160.
- [128] Infect Immun. 2003 Jan; 71(1):374-383.
- [129] Infect Immun. 1999 Oct; 67(10):5395
- 15 [130] Infect Immun. 1997 Nov; 65(11):4476-4482
- [131] Infect Immun. 2004 October; 72(10): 6148
- [132] Proc Natl Acad Sci USA 2004 Aug 24; 101 (34):12652
- [133] Infect Immun. 2004 July; 72(7):3829
- [134] Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 1;1702(2):145
- 20 [135] J Autoimmun. 1989 Jun; 2 Suppl:81
- [136] WO02/02606
- [137] Kalman y col. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
- [138] Read y col. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
- [139] Shirai y col. (2000) J. Infect. Dis. 181 (Suppl 3):S524-S527.
- 25 [140] WO99/27105.
- [141] WO00/27994.
- [142] Infect Immun. 2003 Oct 7; 71(10):5498-504
- [143] Infect Immun. 2001 May; 69(5):3323-3334
- [144] J Clin Microbiol. 1999 Dec; 37(12):3997
- 30 [145] Ross y col. (2001) Vaccine 19:4135-4142.
- [146] Anderson (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S59-65.
- [147] Kahn (2000) Curr Opin Pediatr 12:257-262.
- [148] Crowe (1995) Vaccine 13:415-421.
- [149] J Gen Virol. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229
- 35 [150] Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
- [151] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
- [152] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.

- [153] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [154] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [155] Houghton y col., *Hepatology* (1991) 14:381
- [156] Hsu y col. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- 5 [157] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6
- [158] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
- [159] WO2004/92360
- [160] Patente de EE.UU. 5.378.814
- [161] Patente de EE.UU. 6.333.164
- 10 [162] WO00/15255
- [163] Solicitud de patente de EE.UU. 20020007173.
- [164] Patente de EE.UU. 5.693.522.
- [165] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326.
- [166] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384.
- 15 [167] Dermine, S. y col, "Cancer Vaccines and Immunotherapy," *British Medical Bulletin*, 2002, 62, 149-162
- [168] Espinoza-Delgado I., "Cancer Vaccines," *The Oncologist*, 2002, 7(suppl3):20-33
- [169] Davis, I.D. y col., "Rational approaches to human cancer immunotherapy," *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 23:3-29
- 20 [170] Van den Eynde B y col., "New tumor antigens recognized by T cells", *Curr. Opin. Immunol.*, 1995, 7:674-81
- [171] Rosenberg SA, "Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens, *Immunol. Today*, 1997, 18:175-82
- 25 [172] Offringa R y col., "Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer", *Current Opin. Immunol.*, 2000, 2:576-582
- [173] Rosenberg SA, "A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens," *Immunity*, 1999, 10:281-7
- [174] Sahin U y col., "Serological identification of human tumor antigens," *Curr. Opin. Immunol.*, 1997, 9:709-16
- 30 [175] Old LJ y col., "New paths in human cancer serology," *J. Exp. Med.*, 1998, 187:1163-7
- [176] Chaux y col., "Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 1999, 189:767-78
- [177] Gold P y col., "Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system," *J. Exp. Med.*, 1965, 122:467-8
- 35 [178] Livingston PO y col., Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer: Rationale," *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, 45:1-6
- [179] Livingston PO y col., Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer: Previous experience and future plans," *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, 45:10-9
- 40 [180] Taylor-Papadimitriou J, "Biology, biochemistry and immunology of carcinoma-associated mucins," *Immunol. Today*, 1997, 18:105-7
- [181] Zhao X-J y col., "GD2 oligosaccharide: target for cytotoxic T lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 1995, 182:67-74
- [182] Theobald M y col., "Targeting p53 as a general tumor antigen," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92:11993-7

- [183] Gaudernack G, "T cell responses against mutant ras: a basis for novel cancer vaccines," Immunotechnology, 1996, 2:3-9
- [184] WO91/02062
- [185] Patente de EE.UU. 6.015.567
- 5 [186] WO01/08636
- [187] WO96/30514
- [188] Patente de EE.UU. 5.846.538
- [189] Patente de EE.UU. 5.869.445
- [190] Ingram (2001) Trends Neurosci 24:305-307.
- 10 [191] Patente de EE.UU. 6.884.435.
- [192] WO98/20734.
- [193] WO03/009869
- [194] WO01/30390.
- [195] Vaccine Design. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- 15 [196] WO00/23105.
- [197] WO90/14837.
- [198] Podda (2001) Vaccine 19:2673-80.
- [199] Frey y col. (2003) Vaccine 21:4234-7.
- [200] Patente de EE.UU. 6.299.884.
- 20 [201] Patente de EE.UU. 6.451.325.
- [202] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- [203] Hariharan y col. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- [204] Patente de EE.UU. 5.057.540.
- [205] WO96/33739.
- 25 [206] EP-A-0109942.
- [207] WO96/11711.
- [208] WO00/07621.
- [209] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [210] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- 30 [211] Niikura y col. (2002) Virology 293:273-280.
- [212] Lenz y col. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
- [213] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
- [214] Gerber y col. (2001) Virol 75:4752-4760.
- [215] WO03/024480
- 35 [216] WO03/024481
- [217] Gluck y col. (2002) Vaccine 20:B 10-B16.
- [218] EP-A-0689454.
- [219] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.

- [220] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [221] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [222] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [223] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- 5 [224] WO02/26757.
- [225] WO99/62923.
- [226] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [227] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [228] WO98/40100
- 10 [229] Patente de EE.UU. 6.207.646.
- [230] Patente de EE.UU. 6.239.116.
- [231] Patente de EE.UU. 6.429.199.
- [232] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [233] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- 15 [234] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [235] WO01/95935.
- [236] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [237] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [238] WO03/035836.
- 20 [239] WO95/17211.
- [240] WO98/42375.
- [241] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [242] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [243] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- 25 [244] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [245] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [246] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [247] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [248] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- 30 [249] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [250] WO03/011223.
- [251] WO99/40936
- [252] Matsui M. y col. (2004) *J. Virol* 78: 9093.
- [253] WO99/44636.
- 35 [254] Lillard JW y col., (2003) *Blood* Feb 1; 101 (3):807-14. Epub 2002 Sep 12.
- [255] Singh y col] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [256] WO99/27960.

- [257] Patente de EE.UU. 6.090.406
- [258] Patente de EE.UU. 5.916.588
- [259] EP-A-0626169.
- [260] WO99/52549.
- 5 [261] WO01/21207.
- [262] WO01/21152.
- [263] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [264] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [265] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- 10 [266] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [267] WO04/60308
- [268] WO04/64759.
- [269] US 6.924.271.
- [270] US2005/0070556.
- 15 [271] US 5.658.731.
- [272] Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [273] US2005/0215517.
- [274] WO02/072012
- 20 [275] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [276] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
- [277] W02004/064715.
- [278] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
- [279] PCT/US2005/022769.
- 25 [280] WO2004/87153.
- [281] US 6.605.617.
- [282] WO02/18383.
- [283] WO2004/018455.
- [284] WO03/082272.
- 30 [285] Patente de EE.UU. 5.011.828.
- [286] US-6586409.
- [287] WO99/11241.
- [288] WO94/00153.
- [289] WO98/57659.
- 35 [290] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [291] Costantino, P., et al (1992). *Vaccine* 10:691-8.
- [292] Costantino, P. y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-63.
- [293] Ravenscroft, N., G. y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-16.

- [294] WO 03/007985
- [295] Porro, M., P. y col. (1985) Mol Immunol 22:907-19.
- [296] Goldblatt, D. y col. (1998) J Infect Dis 177:1112-5
- [297] Carlone, G. M. y col. (1992) J Clin Microbiol 30:154-9.
- 5 [298] Grabowska, K. y col. (2002) J Immunol Methods 271:1-15.
- [299] Baraldo, K. y col. (2004) Infect Immun 72:4884-7.
- [300] Mawas, F. y col. (2004) J Infect Dis 190:1177-82.
- [301] Goldblatt, D. y col. (1998) J Infect Dis 177:1112-5.
- [302] Granoff, D. M. y col. (1998) Clin Diagn Lab Immunol 5:479-85.
- 10 [303] Schallert, N. y col. (2002) Eur J Immunol 32:752-60.
- [304] Valmori, D. y col. (1992) J Immunol 149:717-21.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- SEC ID NO: 1 (P23TT)**  
1 VSIDKFRIFC KANPK
- 15 **SEC ID NO: 2 (P32TT)**  
1 LKFIKRYTP NNEIDS
- SEC ID NO: 3 (P21TT)**  
1 IREDNNITLK LDRCNN
- SEC ID NO: 4 (PFCs)**  
20 1 EKKIAKMEKA SSVFNWVN
- SEC ID NO: 5 (P30TT)**  
1 FNNFTVSFWL RVPKVSASHL E
- SEC ID NO: 6 (P2TT)**  
1 QYIKANSKFI GITE
- 25 **SEC ID NO: 7 (VBVnc)**  
1 PHHTALRQAI LCWGELMTLA
- SEC ID NO: 8 (HA)**  
1 PKYVKQNTLK LAT
- SEC ID NO: 9 (HBsAg)**  
30 1 FFLTRILTI PQSLD
- SEC ID NO: 10 (MT)**  
1 YSGPLKAEIA QRLEDV
- SEC ID NO: 11 (N19)**

ES 2 356 670 T3

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Asp  
1 5 10 15  
Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Ile Glu Gly Arg Lys Gly Val Ser Ile Asp  
20 25 30  
Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Asn Pro Lys Lys Gly Leu Lys Phe  
35 40 45  
Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser Lys Gly Ile  
50 55 60  
Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Lys

65					70					75					80
Gly	Glu	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Met	Glu	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Phe	Asn
				85					90					95	
Val	Val	Asn	Ser	Lys	Gly	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu
		100					105						110		
Arg	Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Lys	Gly	Gln	Tyr	Ile
		115					120					125			
Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Lys	Gly	Gly	Ser	Pro
	130					135					140				
His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu	Leu	Met
145					150					155					160
Thr	Leu	Ala	Lys	Gly	Ser	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys
				165					170					175	
Leu	Ala	Thr	Lys	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile
			180					185					190		
Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ser	Gly	Pro	Leu	Lys	Ala	Glu	Ile
		195					200					205			
Ala	Gln	Arg	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Asp	Lys	Phe
	210					215					220				
Arg	Ile	Phe	Cys	Lys	Ala	Asn	Pro	Lys	Lys	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ile
225					230					235					240
Lys	Arg	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asn	Glu	Ile	Asp	Ser	Lys	Gly	Ile	Arg	Glu
				245					250					255	
Asp	Asn	Asn	Ile	Thr	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Cys	Asn	Asn	Lys	Gly	Glu
			260					265					270		
Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Met	Glu	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Phe	Asn	Val	Val
		275					280					285			
Asn	Ser	Lys	Gly	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg	Val
	290					295					300				
Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Lys	Gly	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala
305					310					315					320
Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Lys	Gly	Gly	Ser	Pro	His	His
			325						330					335	
Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu	Leu	Met	Thr	Leu
			340					345					350		
Ala	Lys	Gly	Ser	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Ala
		355					360					365			
Thr	Lys	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln
	370					375					380				
Ser	Leu	Asp	Lys	Gly	Ser										
385					390										

**SEC ID NO: 12 (marca de inmutuafinidad)**

1 MDYKDDDD

**SEC ID NO: 13 (sitio de reconocimiento del factor Xa)**

1 IEGR

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Una composición que comprende una combinación de dos o más conjugados monovalentes, en la que cada uno de dicho dos o más conjugados monovalentes comprende (i) proteína portadora N19 conjugada con (ii) un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W-135 o Y de *N. meningitidis*.
- 5 2.- Un conjugado W-135 multivalente que comprende dos o más antígenos de sacárido antigénicamente distintos de los serogrupos A, C, W-135 o Y de *N. meningitidis* en el que dichos antígenos de sacárido están conjugados con la proteína portadora N19.
- 3.- Una composición que comprende dos o más de los conjugados multivalentes según la reivindicación 2.
- 10 4.- Una composición que comprende uno o más conjugados multivalentes según la reivindicación 2 y uno o más conjugados monovalentes como se definen en la reivindicación 1.
- 5.- Una composición según las reivindicaciones 1 ó 4, en la que una molécula de dicha proteína portadora en dicho conjugado monovalente está conjugada con más de una molécula de dicho antígeno de sacárido.
- 15 6.- Una composición según las reivindicaciones 1 ó 4, en la que cada molécula de proteína portadora en cada conjugado monovalente está conjugada con más de una molécula de antígeno de sacárido.
- 7.- Una composición que comprende un primer conjugado y un segundo conjugado, en la que dicho primer conjugado comprende un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W-135 o Y de *N. meningitidis* conjugado con la proteína portadora N19; y dicho segundo conjugado comprende un antígeno de sacárido de los serogrupos A, C, W-135 o Y de *N. meningitidis* conjugado con una proteína portadora diferente de N19.
- 20 8.- Un conjugado o composición según cualquier reivindicación previa que comprende además un adyuvante.
- 9.- Un conjugado o composición según cualquier reivindicación previa para uso en terapia.
- 10.- Un conjugado o composición según cualquier reivindicación previa para uso en provocar una respuesta inmunitaria.
- 25 11.- Uso de un conjugado o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la preparación de un medicamento para fomentar una respuesta inmunitaria en un paciente.

Figura 1

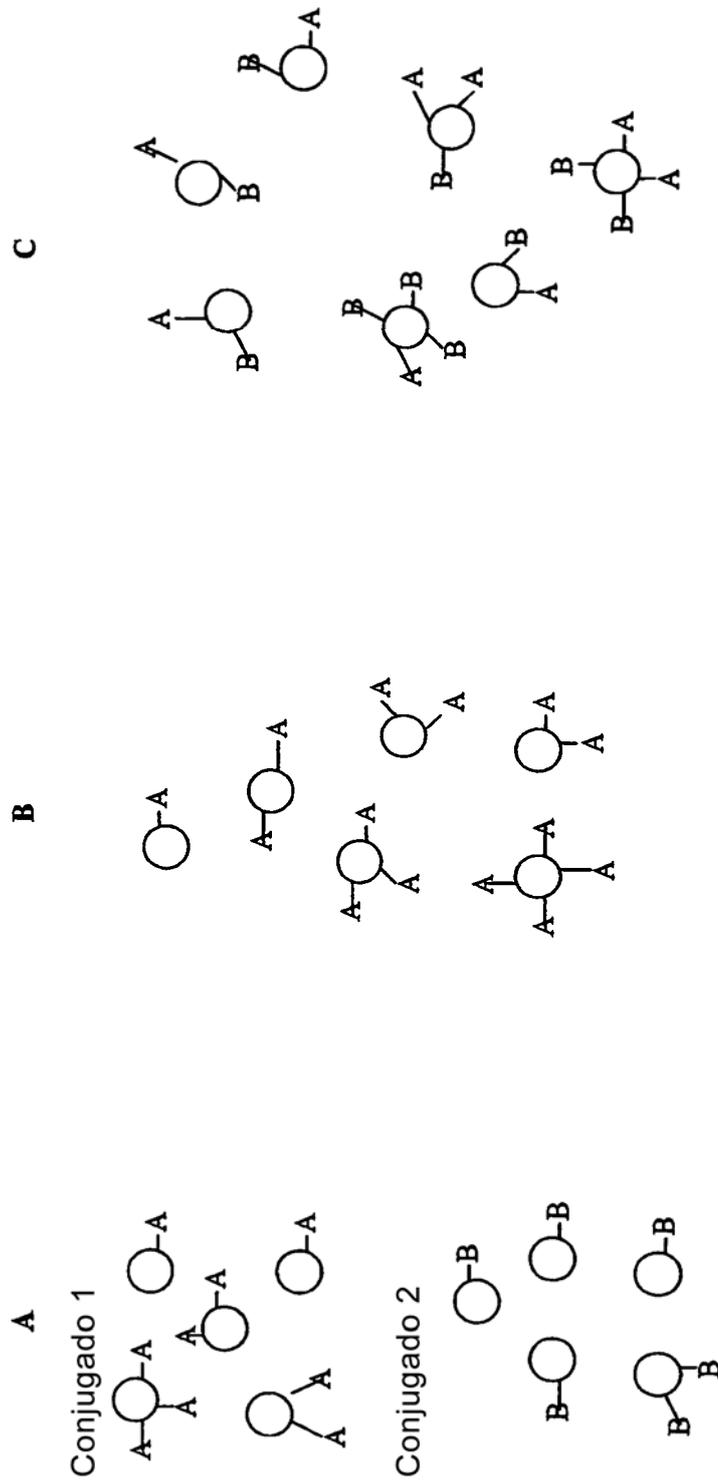


Figura 2

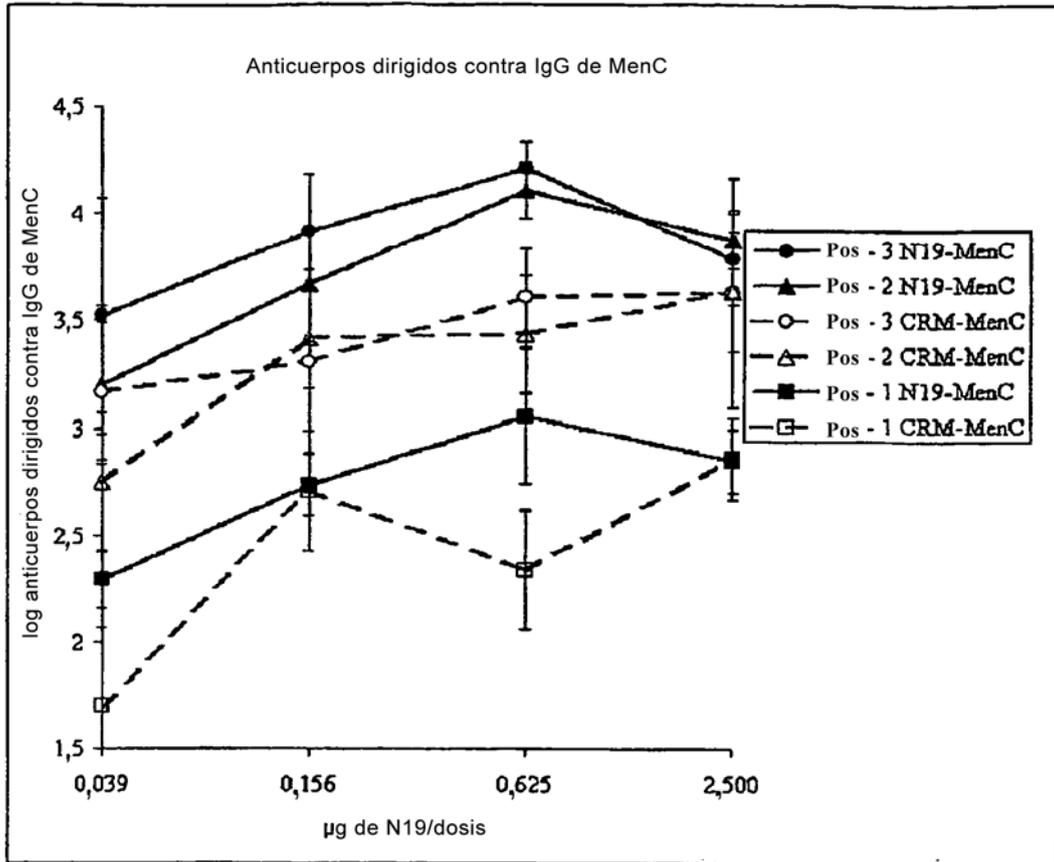


Figura 3

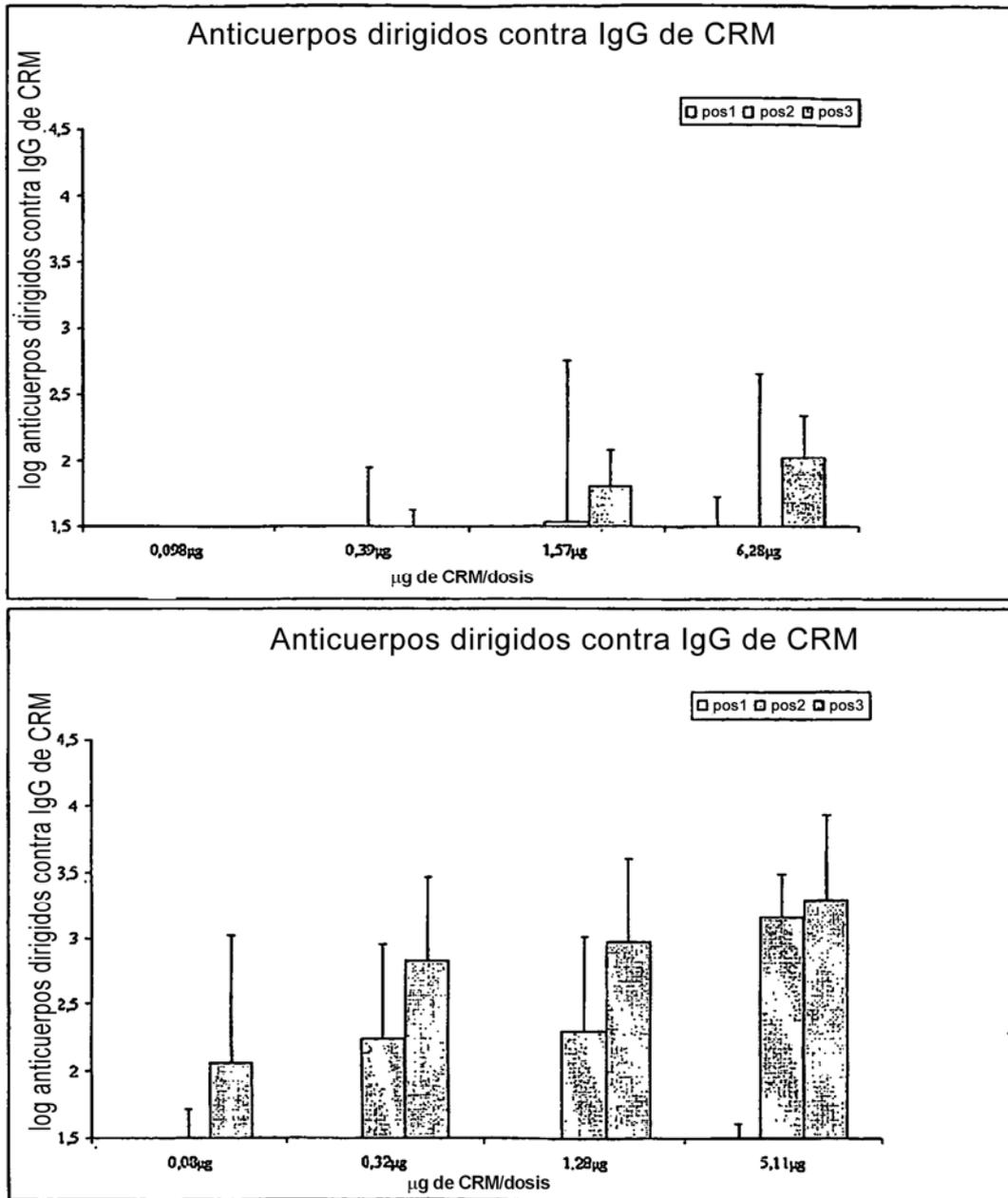


Figura 4

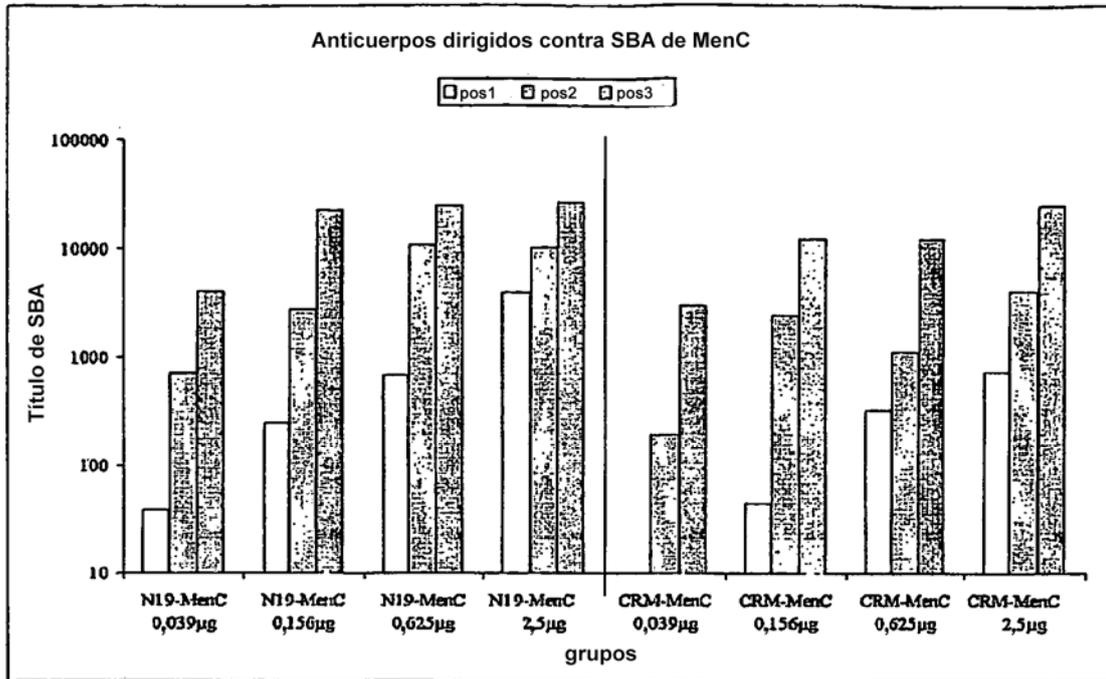


Figura 5

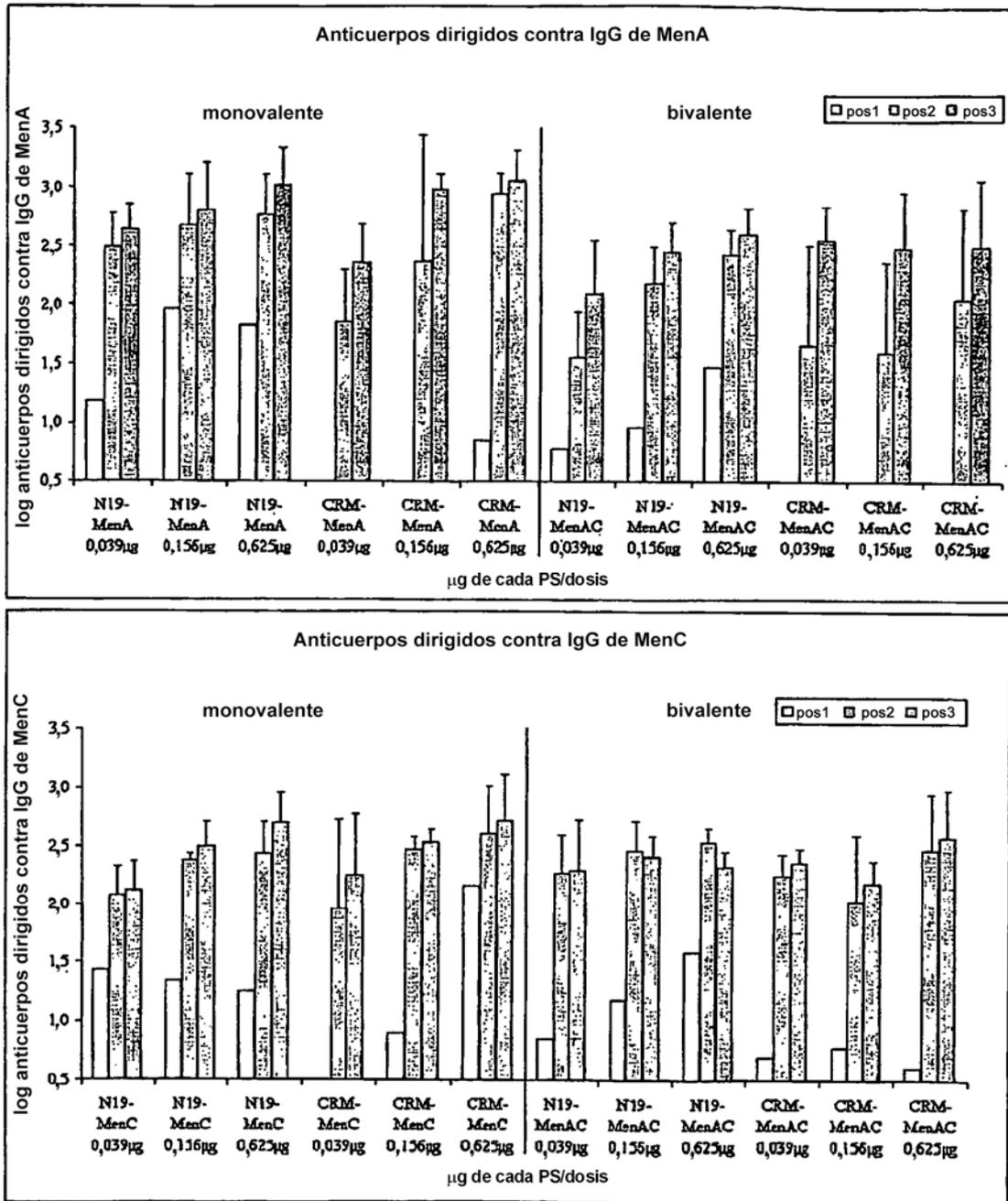


Figura 6

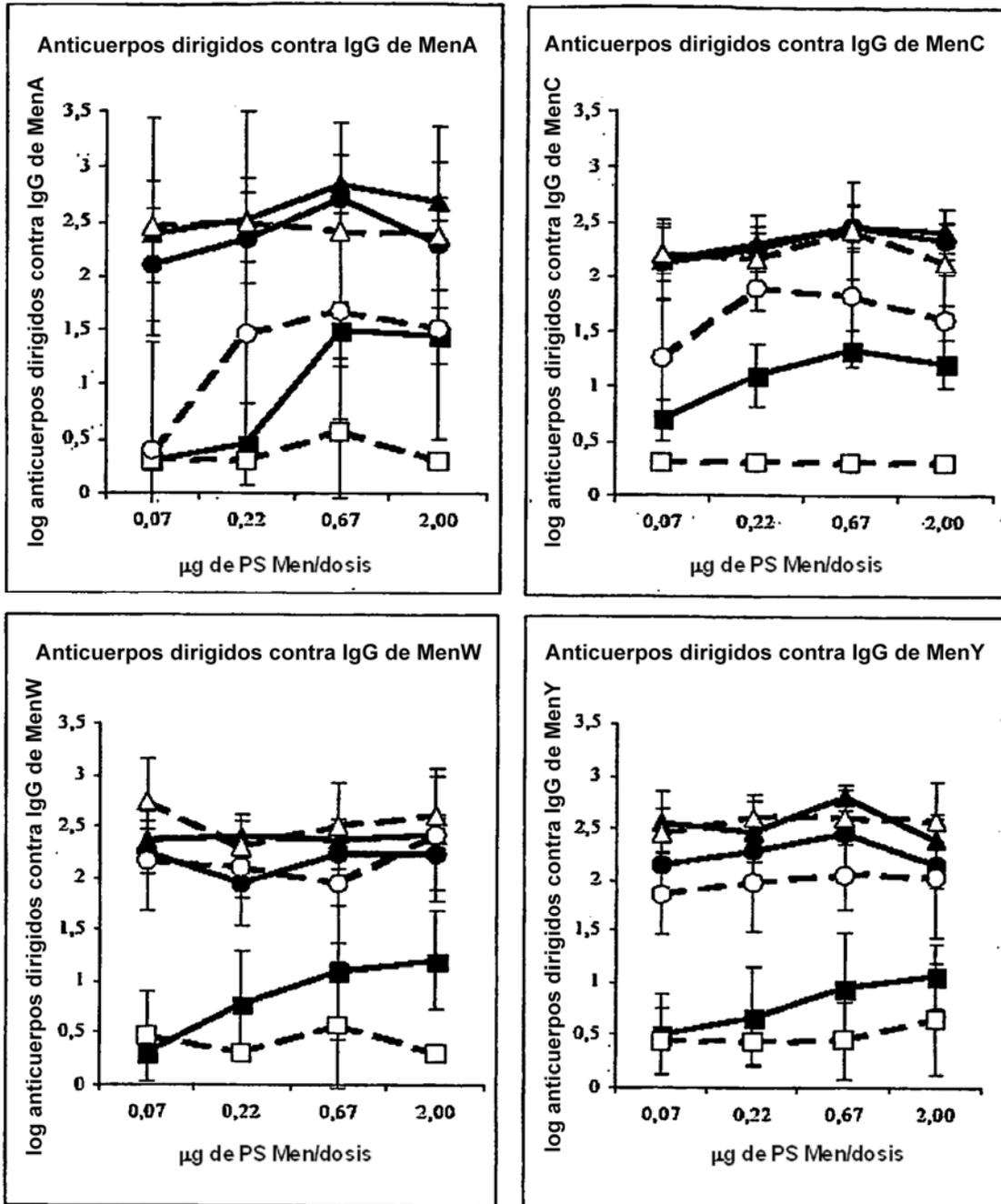


Figura 7

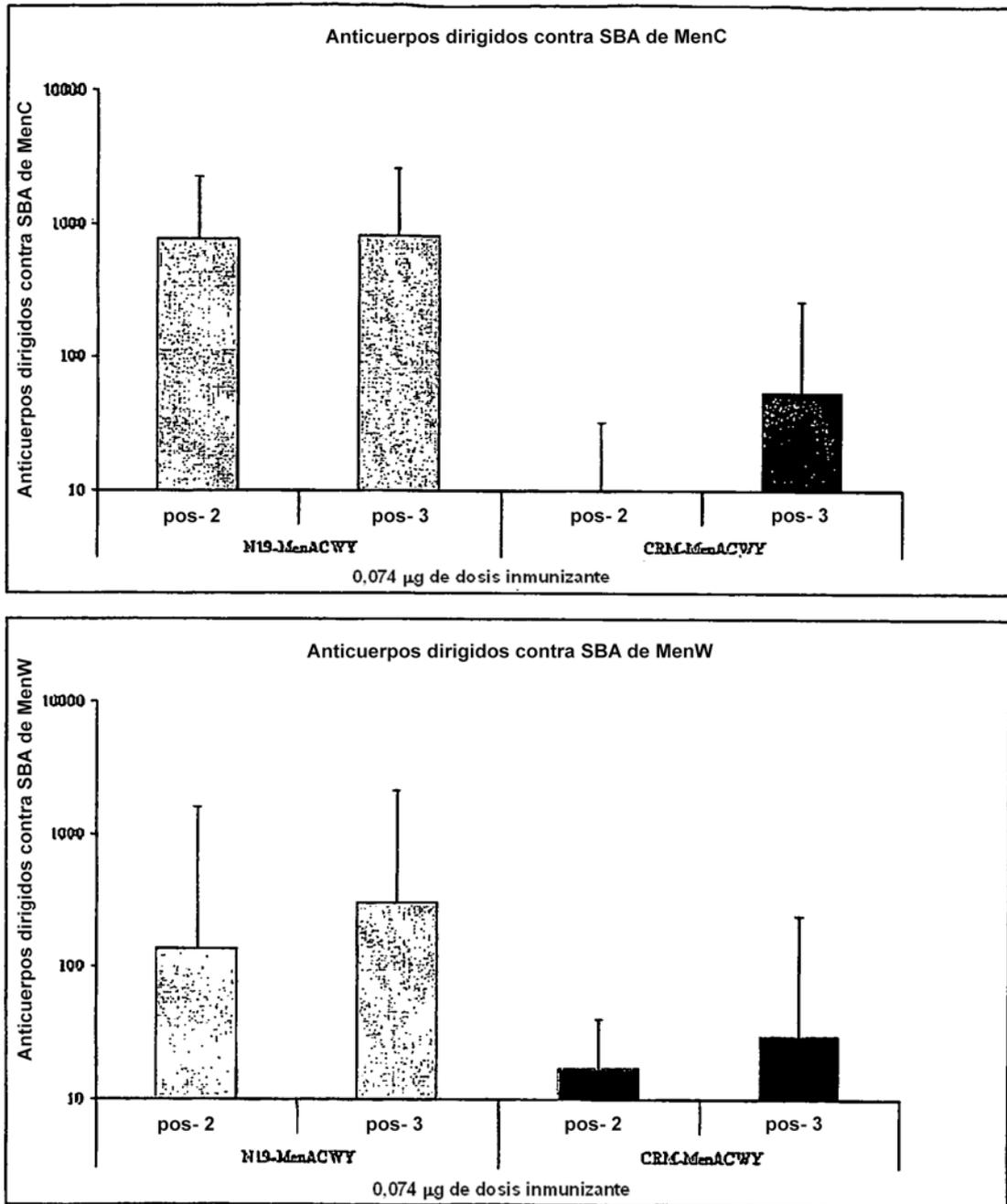


Figura 8

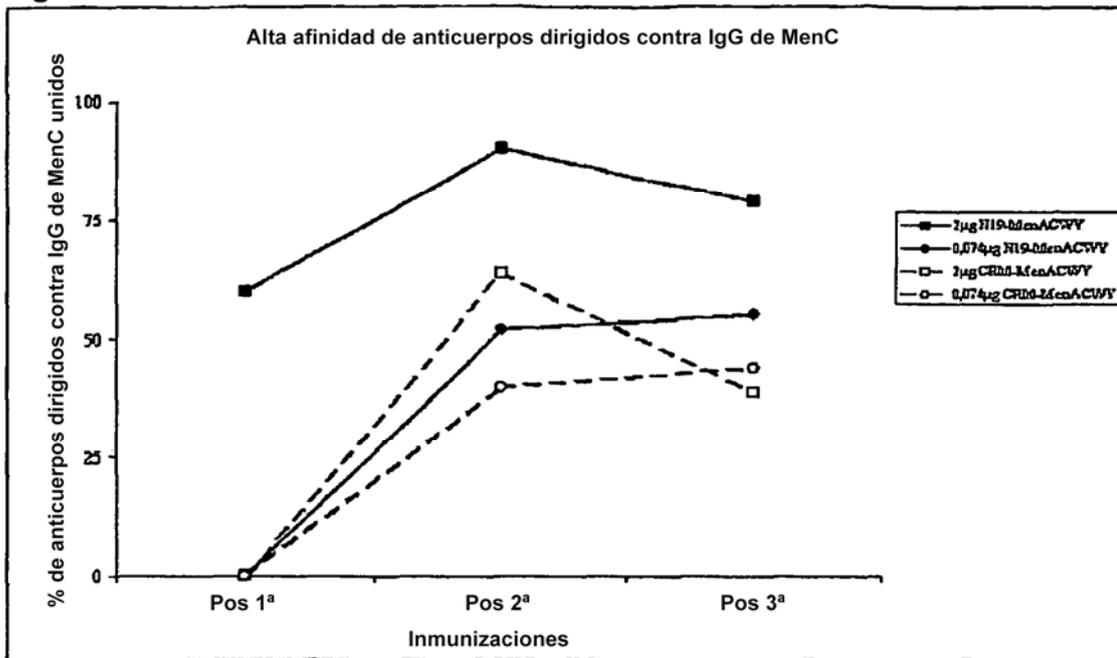


Figura 9

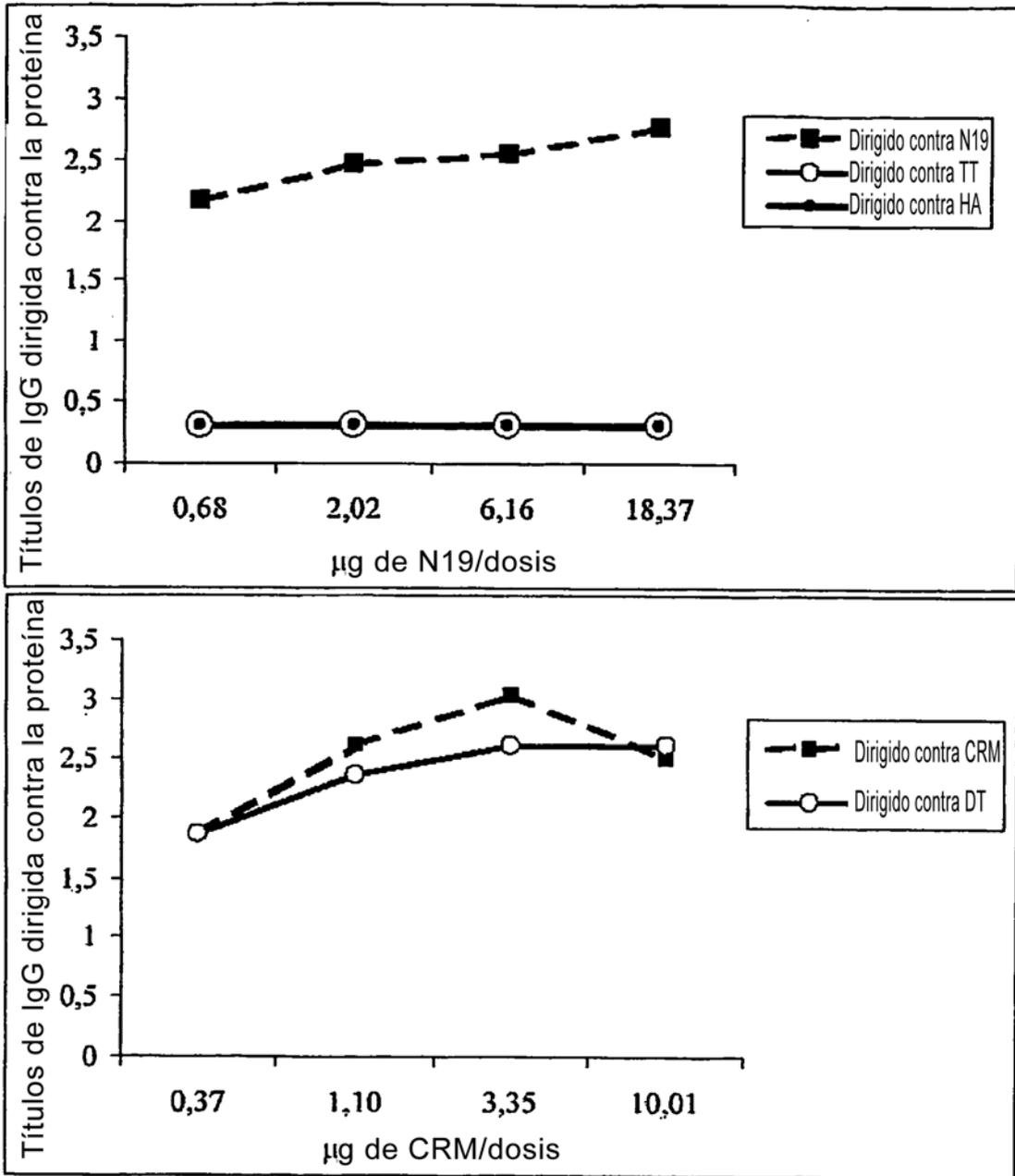


Figura 10

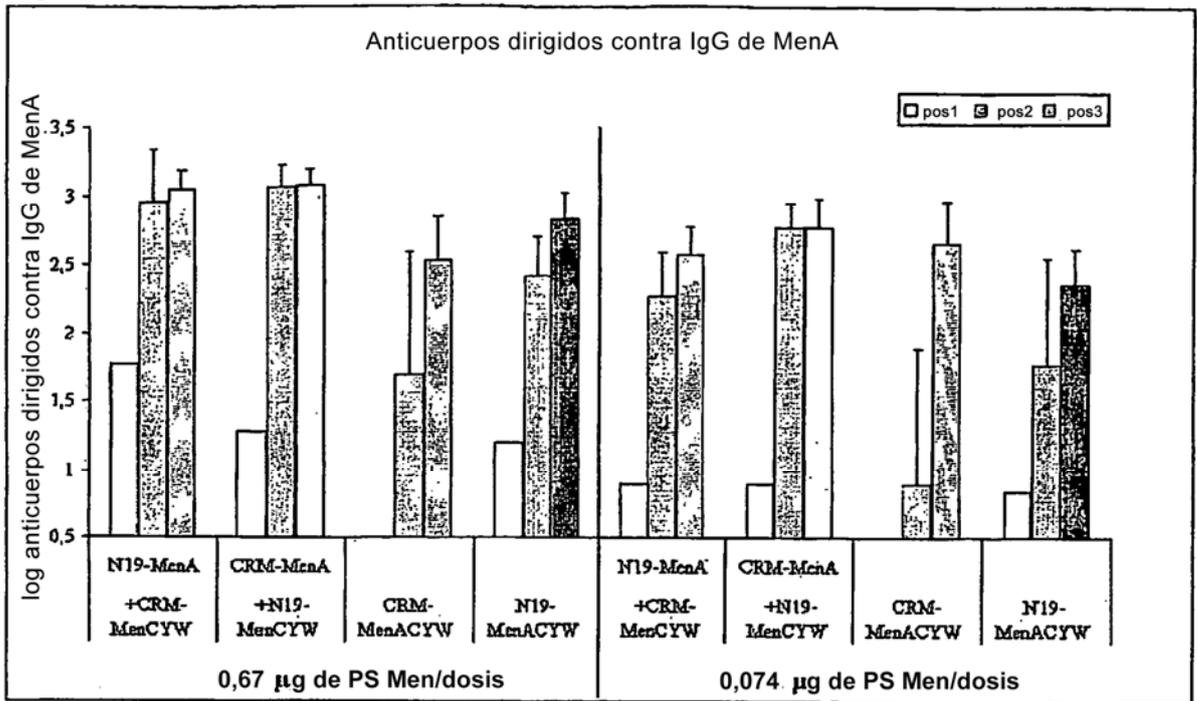


Figura 11

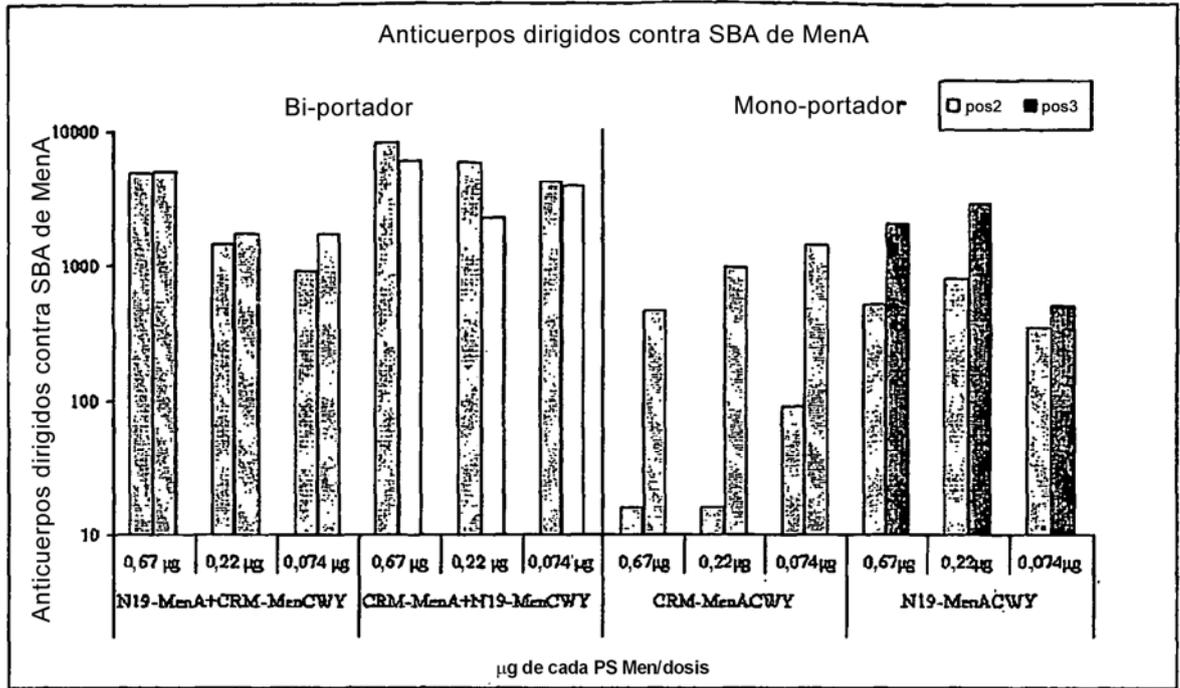


Figura 12

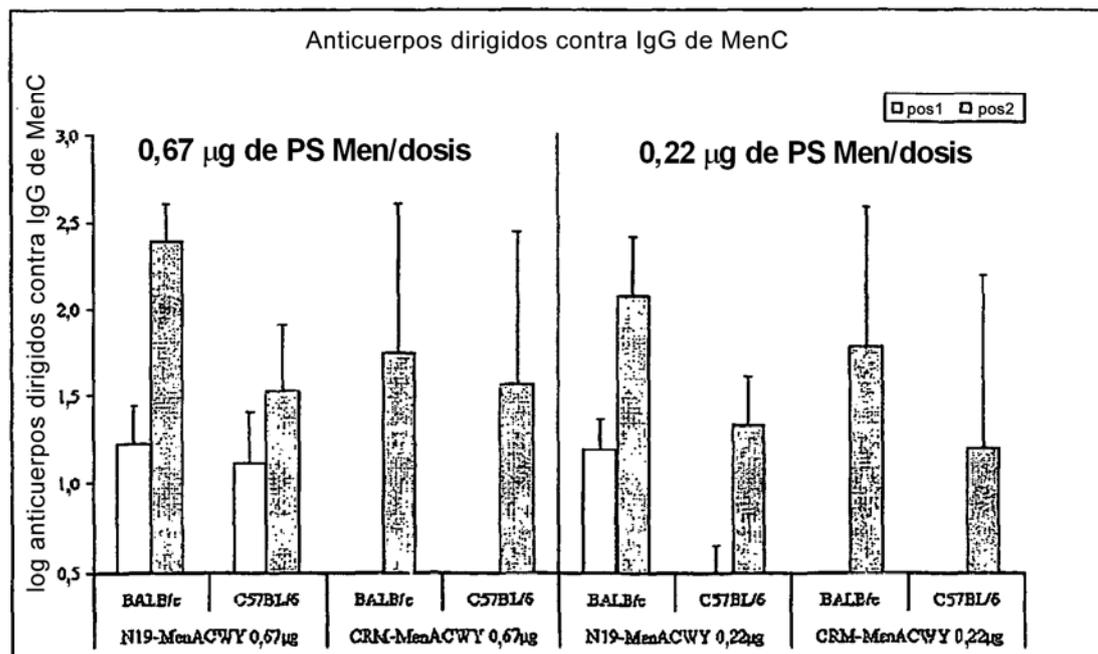
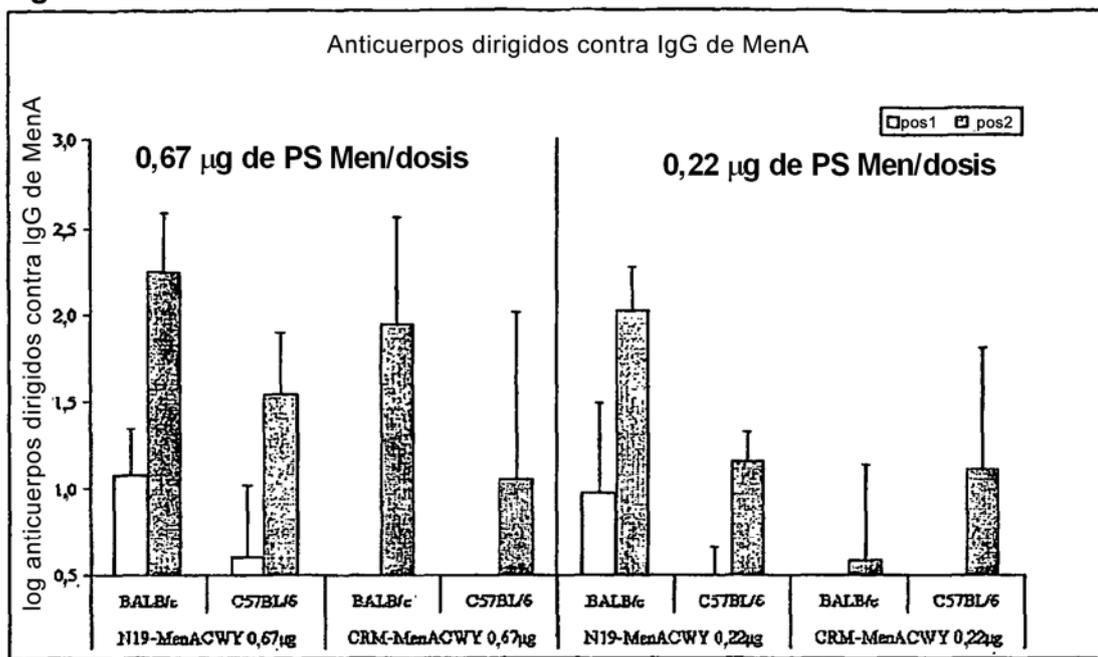


Figura 12 continuación

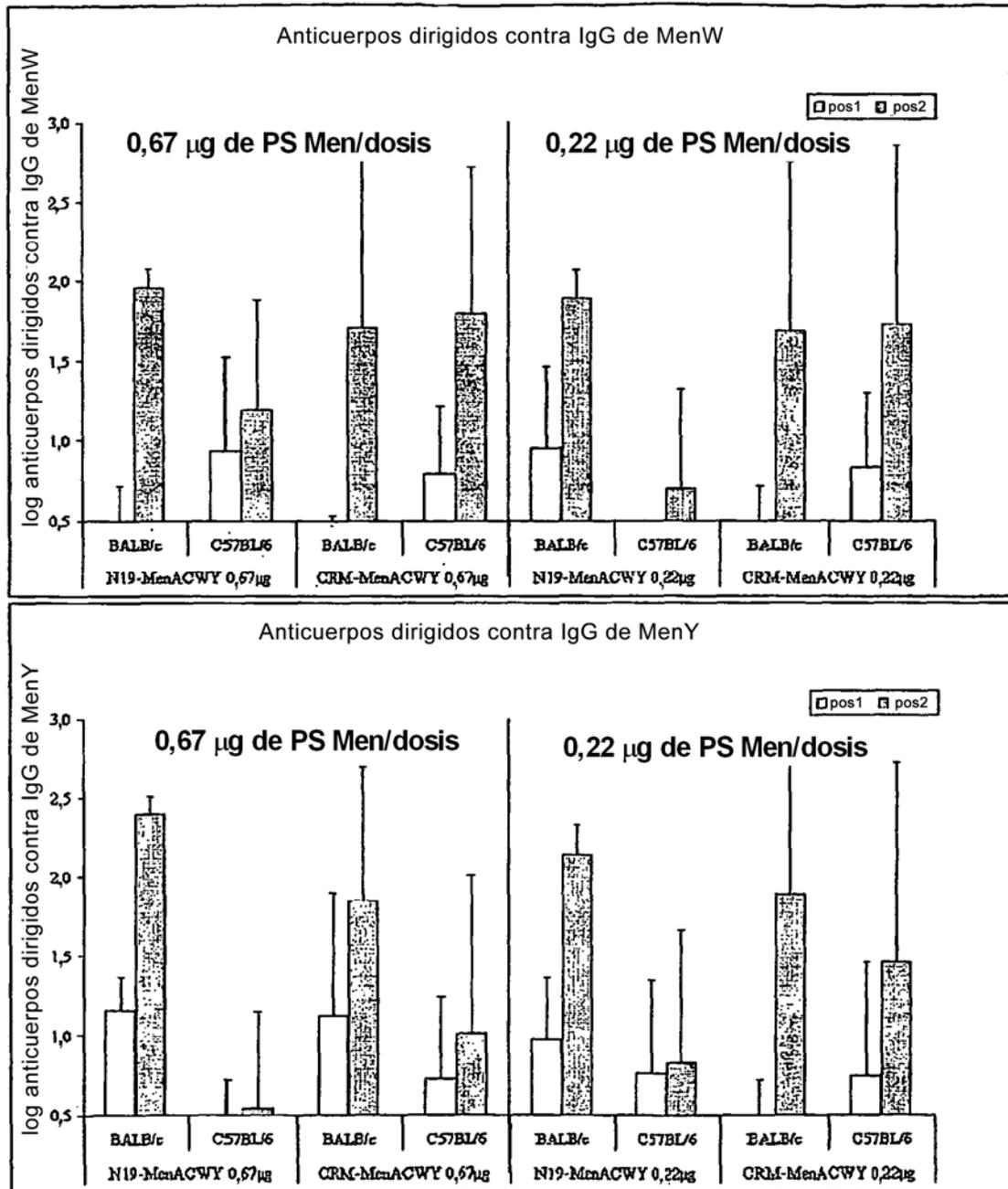


Figura 13

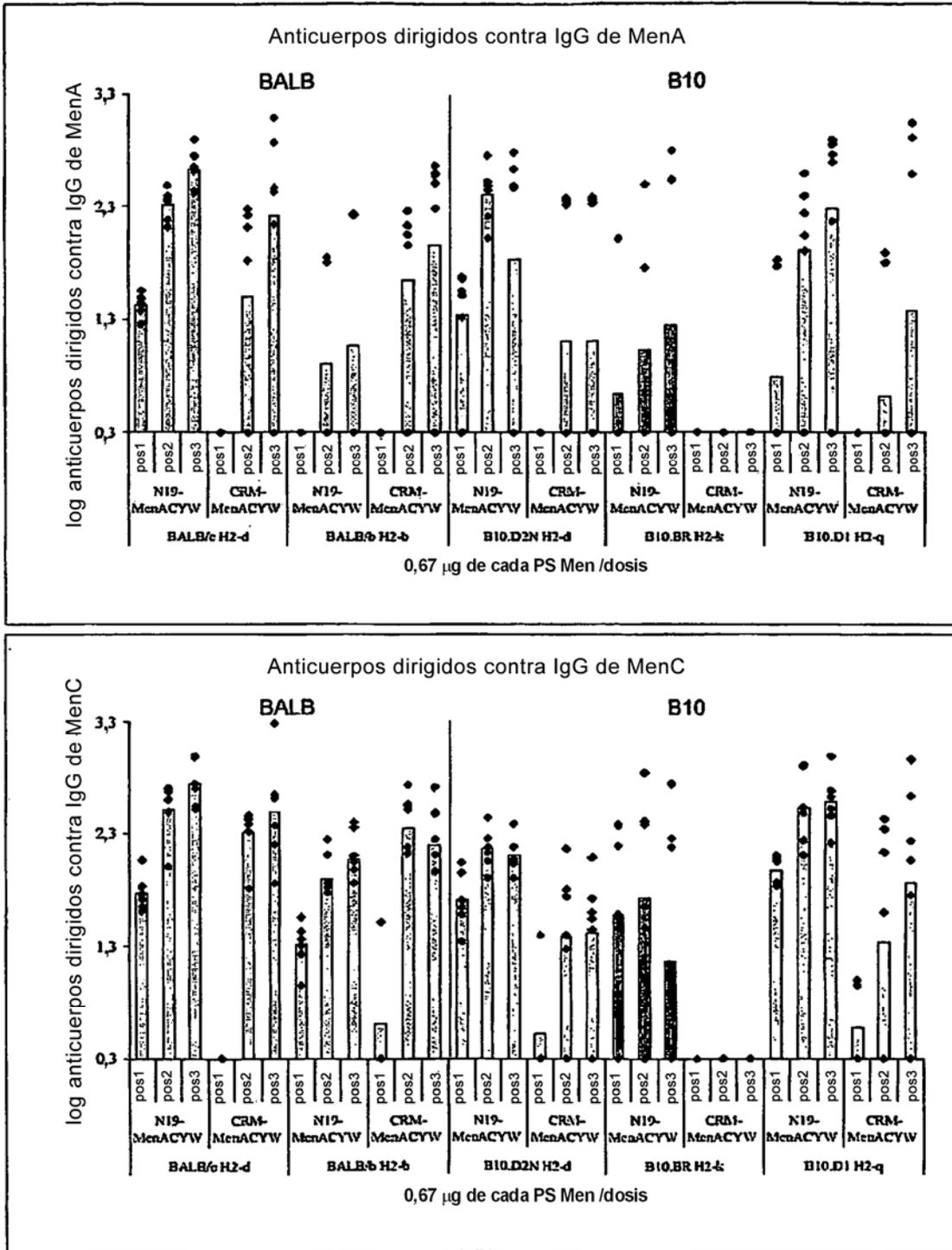


Figura 13 continuación

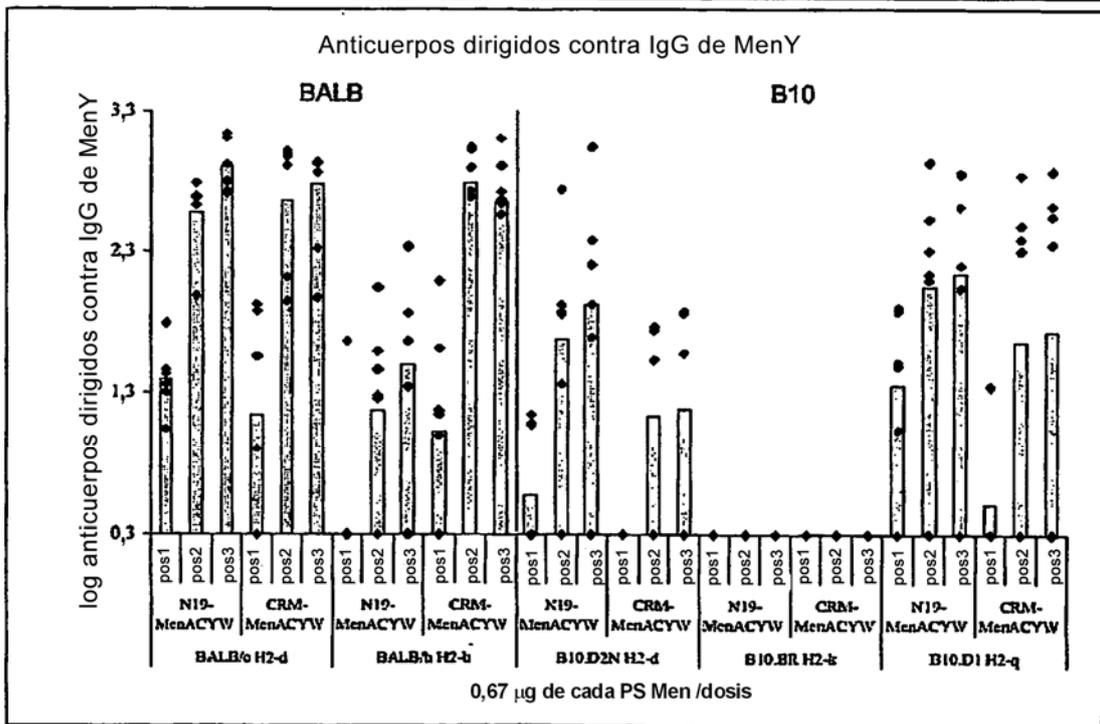
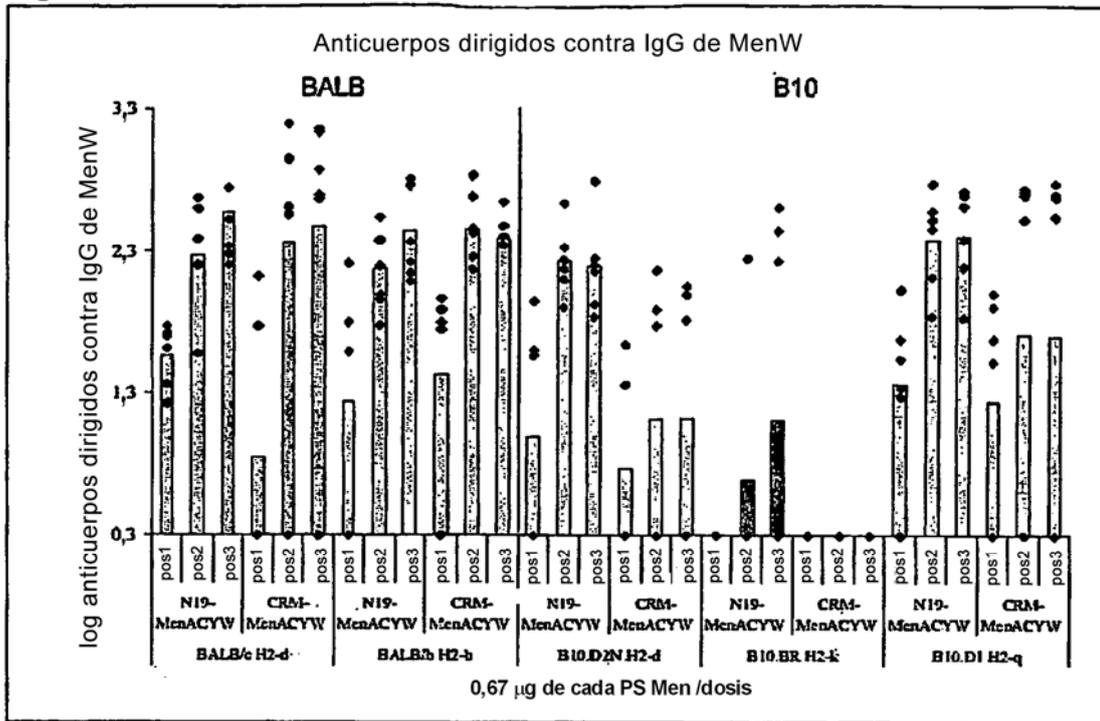


Figura 14

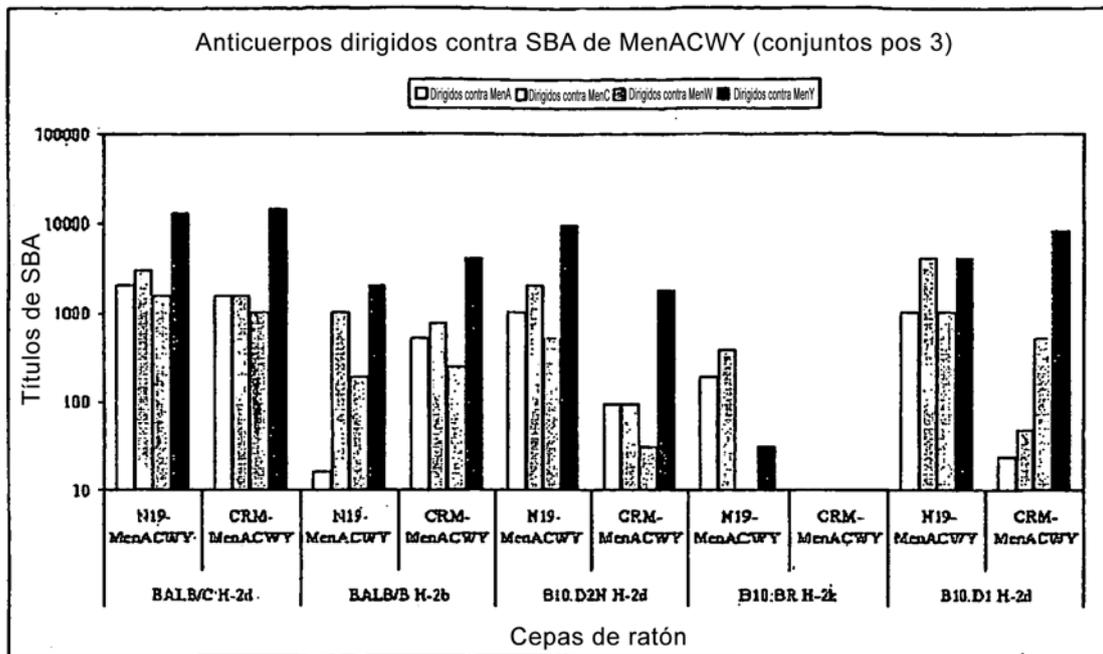


Figura 15

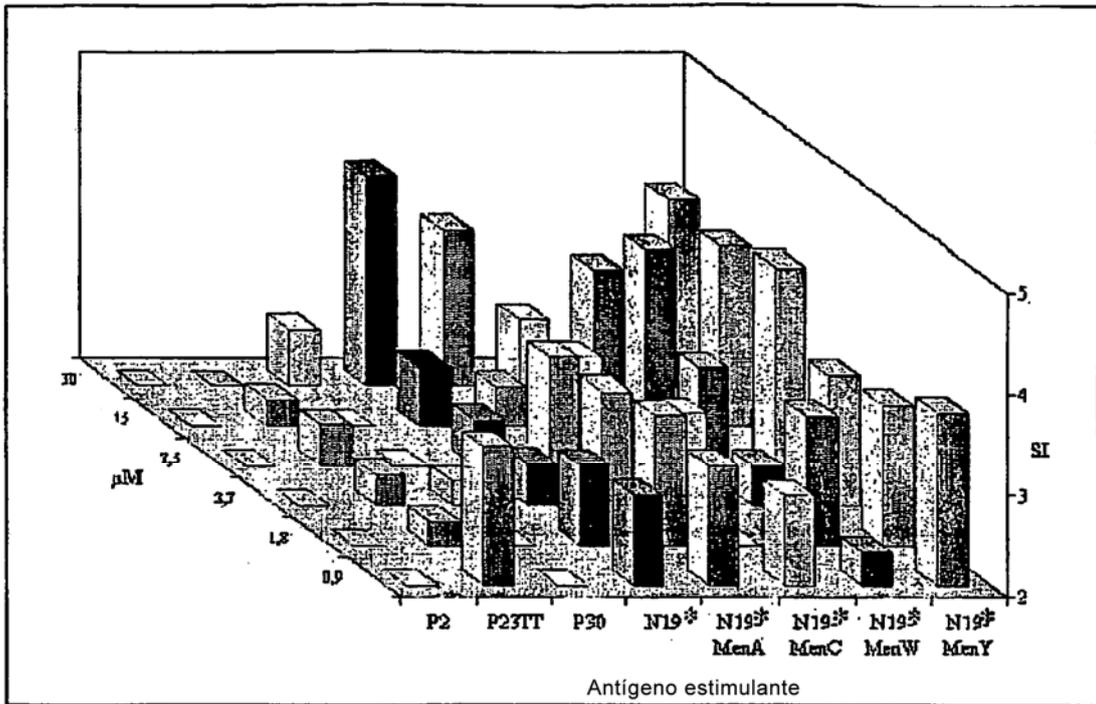


Figura 16

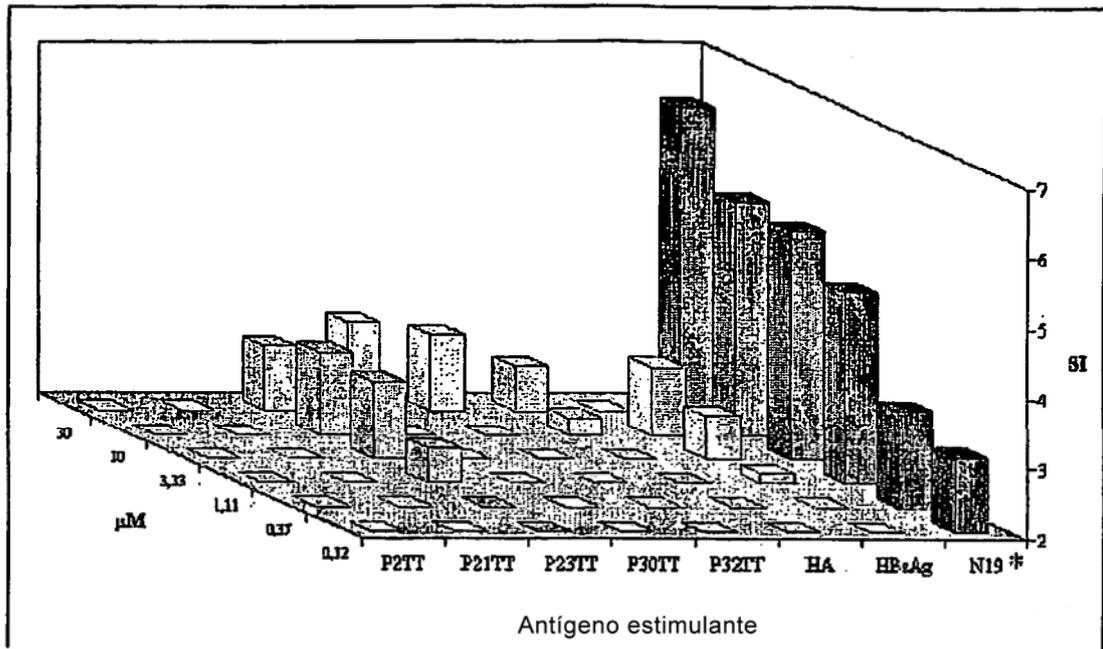


Figura 17

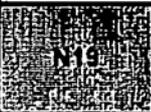
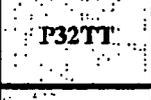
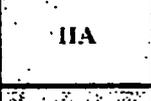
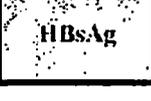
Haplotipo de la cepa de ratón		BALB/c H2-d	BALB/B H2-b	B10.D2N H2-d	B10.BR H2-k	B10.D1 H2-q
Antígeno	$\mu\text{g/ml}$	Índices de estimulación				
 N19	0,1	2,6	1,85	1,35	2,3	2,3
	1,0	3,4	2,33	1,45	3,2	2,7
	10	4,9	2,04	2,04	3,1	1,9
 N19-MenA	0,1	2,7	1,60	1,58	2,3	2,2
	1,0	2,9	1,96	1,66	3,7	2,0
	10	2,9	1,53	1,80	2,6	2,4
 N19-MenC	0,1	2,4	1,27	1,21	1,1	1,9
	1,0	2,7	1,73	1,24	2,3	2,0
	10	3,6	1,83	1,63	2,6	1,6
 N19-MenW	0,1	2,5	2,09	<1	1,8	1,6
	1,0	2,8	1,97	1,22	2,5	1,4
	10	2,8	1,58	2,08	2,4	3,5
 N19-MenY	0,1	2,4	1,49	1,08	2,3	1,4
	1,0	2,3	1,46	1,13	2,4	1,5
	10	2,6	1,55	1,24	2,1	2,9
 CRM	0,1	<1	<1	<1	<1	<1
	1,0	<1	<1	<1	<1	<1
	10	<1	<1	<1	<1	<1
Haplotipo de la cepa de ratón		BALB/c H2-d	BALB/B H2-b	B10.D2N H2-d	B10.BR H2-k	B10.D1 H2-q
Antígeno	$\mu\text{M}$	Índices de estimulación				
 P2TT	1,7	1,1	1,4	<1	<1	1,1
	5	1,6	1,7	<1	<1	1,4
	15	1,4	1,3	<1	<1	1,4
 P30EI	1,7	2,2	2,3	<1	1,3	1,0
	5	2,2	3,1	<1	1,3	1,1
	15	1,9	3,3	<1	1,5	1,2
 P23TT	1,7	2,4	1,1	1,3	1,7	1,4
	5	2,4	1,2	1,3	2,2	1,3
	15	2,8	1,4	1,5	2,7	1,2
 P21TT	1,7	1,4	1,0	<1	<1	<1
	5	1,3	1,1	<1	<1	<1
	15	1,2	1,5	<1	<1	<1
 P32TT	1,7	1,0	1,1	<1	1,3	<1
	5	1,0	1,2	<1	1,6	<1
	15	1,2	1,4	<1	2,3	<1
 HIA	1,7	1,5	1,1	1,2	<1	1,4
	5	1,7	1,3	1,3	<1	<1
	15	1,8	1,3	1,3	<1	<1
 HBsAg	1,7	1,7	1,6	<1	<1	<1
	5	1,7	1,7	1,2	<1	<1
	15	1,8	1,4	1,1	<1	<1

Figura 18

