

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 118**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/16** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61K 39/09** (2006.01)  
**B01D 15/38** (2006.01)  
**B01J 20/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2008 E 08826340 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2180901**

54 Título: **Purificación de conjugados utilizando hidroxipatita**

30 Prioridad:

**17.07.2007 GB 0713880**

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

**24.03.2015**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse, 35  
4056 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**BIGIO, MASSIMO;  
AVERANI, GIOVANNI;  
NORELLI, FRANCESCO;  
BERTI, FRANCESCO y  
BELLUCCI, CINZIA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 532 118 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).

**Purificación de conjugados utilizando hidroxipatita****Descripción**

5

**ÁMBITO TÉCNICO**

[001] Este invento pertenece al ámbito de las vacunas y está relacionado con un nuevo método para la purificación de conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos.

10 **CONTEXTO DE LA TÉCNICA**

[002] En los últimos 20 años, se han desarrollado vacunas conjugadas, que comprenden polisacáridos capsulares bacterianos conjugados con portadores proteicos. Entre los ejemplos se incluye la vacuna conjugada [1] *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) [1], así como las vacunas conjugadas contra el *Streptococcus pneumoniae* [2] y el serogrupo C *Neisseria meningitidis* (MenC) [3]. WO 2006/110381 se refiere a un compuesto conjugado multivalente de neumococo polisacárido-proteico.

15

[003] Las proteínas portadoras que se utilizan en las vacunas autorizadas incluyen el tétanos toxoide (TT), la difteria toxoide (DT), el mutante CRM197 no tóxico de la toxina de la difteria, y el complejo de la proteína de la membrana externa del grupo B de *N.meningitidis*. Lo ideal sería que una proteína portadora introdujese un importante efecto de ayuda a un epítipo de célula B conjugado (por ejemplo, un polisacárido) sin inducir una respuesta de anticuerpo contra sí mismo. El uso de inmunogénicos en el contexto de la mayor parte de las moléculas de histocompatibilidad mayor de complejos de clase II, es una aproximación a este objetivo [4]. Dichos epítopos se han identificado dentro de TT y otras proteínas. De forma alternativa, podrían usarse proteínas portadoras de multi-epítipo, como las descritas en la referencia 5.

20

25

[004] Una vez que se ha conjugado un antígeno sacárido a una proteína portadora, la mezcla de la reacción debería purificarse para retirar la proteína portadora libre que no tiene conjugados antígenos sacáridos y sacáridos no conjugados.

30

[005] En este ámbito se conocen varios métodos para la purificación de proteína portadora libre y conjugada, incluida la cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [ver también las refs. 6 y 7, etc.]. De todas formas, estos métodos tienen varias desventajas. Por ejemplo, la referencia 8 propone el uso de filtración de gel para purificar los conjugados de GBS. Pero este método necesita un gran volumen de matriz de filtración de gel y es difícil de aplicar a escala industrial. Un método alternativo que implica la ultrafiltración, por ejemplo usando diafiltración de flujo tangencial con una membrana de 100kDa, no es eficaz a no ser que el antígeno sacárido tenga un peso molecular adecuado y de esa forma no es adecuado para los conjugados de GBS serotipo III conjugados u otros conjugados en los que el antígeno sacárido sea <100kDa. Además, la ultrafiltración puede tener como resultado una baja productividad y tensionar el conjugado.

35

40

[006] Por lo tanto, el objeto de este invento es proporcionar un método mejorado para purificar conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos a partir de impurezas como no conjugados de proteína portadora y no conjugados de sacáridos.

**DIVULGACIÓN DEL INVENTO**

[007] Se ha descubierto que el conjugado de sacáridos antígenos a proteínas portadoras puede modificar la capacidad de unión de las proteínas portadoras con la hidroxipatita. Así, en una mezcla que incluya conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos, no conjugados de proteína portadora y otras proteínas, las proteínas contaminantes/no conjugadas se unen a la hidroxipatita mientras que los conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos no se unen sustancialmente.

45

50

[008] Así, el invento proporciona un método para purificar conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos a partir de una mezcla que incluye proteína portadora libre y conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos, que incluye el contacto de dicha mezcla con de forma que la proteína portadora se una a la hidroxipatita mientras los conjugados no se unan; y recoger los conjugados libres de proteínas de sacáridos portadores de antígenos. La proteína portadora no unida podría eluirse de la hidroxipatita y reutilizarse en una reacción de conjugación, probarse o descartarse.

55

[009] La mezcla podría incluir conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos y proteínas no conjugadas. De todas formas, la mezcla también podría contaminarse con otras proteínas. El método del invento permite retirar cualquier proteína contaminante, proporcionando conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos purificados.

60

[0010] El invento también proporciona un método para preparar un compuesto farmacológico, que incluye los

pasos para i) poner en contacto una mezcla que incluye conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos y proteína libre portadora con hidroxapatita, ii) reunir los conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos libres, y iii) mezclar dichos conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos que se han obtenido en el paso ii) con un diluyente farmacológicamente aceptable o portador. La presentación también proporciona los compuestos que se prepararon por dicho método.

### Proteína portadora

[0011] La proteína portadora podría seleccionarse a partir de las conocidas en esta técnica, como el tétanos toxoide (TT), la difteria toxoide (DT) o derivados de las mismas como el CRM197 no tóxico mutante de toxina de difteria [9-11]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa *N.meningitidis* [12], péptidos sintéticos [13,14], proteínas de choque térmico [15,16], proteínas de tos ferina [17,18], citoquinas [19], linfoquinas [19], hormonas [19], factores de crecimiento [19], proteínas artificiales incluidos epítomos múltiples de célula humana CD4+ T a partir de varios antígenos derivados de patógenos [20] como N19 [21], proteína D de *H.influenzae* [22-24], pneumolisina [25], proteína PspA [26] de superficie pneumocócica, proteínas de absorción de hierro [27], toxina A o B de *C.difficile* [28], etc. De todas formas, podría usarse cualquier proteína portadora mientras se una a la hidroxapatita.

[0012] La difteria toxoide (DT), el tétanos toxoide (TT) y CRM197 son los portadores principales que se usan actualmente en vacunas pediátricas como los conjugados HIBERIX™ y MENITORIX™ a partir de GSK usan TT como portador, el producto HIBTITER™ usa CRM197, los conjugados pneumocócicos de PREVENAR™ usan CRM197, los productos MENJUGATE™ y MENINGITEC™ usan CRM197, y NEISVAC-C™ usa TT.

[0013] De forma alternativa, la proteína portadora podría ser una proteína portadora multi-epítome, como las descritas en la referencia 5. Dichos portadores multi-epítome incluyen N19.

[0014] Preferiblemente, la proteína portadora usada en el invento será CRM197.

### Antígeno sacáridos

[0015] El antígeno sacárido conjugado a la proteína portadora de un compuesto purificado por el invento es un sacárido capsular bacteriano. También podría usarse LPS o LOS como antígeno.

[0016] Preferiblemente, el antígeno sacárido de acuerdo con el invento tendrá un peso molecular de 5KDa o más, y mejor todavía 8KDa o más (por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250KDa o más).

[0017] Entre los ejemplos de sacáridos bacterianos capsulares que podrían incluirse en los compuestos del invento se incluyen sacáridos capsulares a partir de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B, C, W135 y/o Y), *Streptococcus pneumoniae* (serotipos 1,2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14,15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, concretamente 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y/o 23F), *Streptococcus agalactiae* (tipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, y/o VIII, como los sacáridos antígenos descritos en las referencias 29-32), *Haemophilus influenzae* (cepas tipificables: a, b, c, d, e y/o f), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (a partir de, por ejemplo, los serotipos 5 y 8), *Enterococcus faecalis* o *E.faecium* (repeticiones de trisacárido), *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella* spp., etc. Otros sacáridos que podrían incluirse en los compuestos del invento incluyen glucanos (por ejemplo, glucanos fúngicos, como los de *Candida albicans*), y sacáridos capsulares fúngicos, por ejemplo a partir de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*. Otro sacárido que podría incluirse es el antígeno específico de grupo *Streptococcus pyogenes* (carbohidrato de GAS).

[0018] Entre los ejemplos de LPS y LOS se incluye LPS aislado a partir de serotipo PA01,05 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[0018] La cápsula de serogrupo A *N.meningitidis* (MenA) es un homopolímero de ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-unido a N-acetil-D-manosamina-1-fosfato, con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La cápsula del serogrupo B *N.meningitidis* (MenB) es un homopolímero de ácido siálico ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 8) ligado. El sacárido capsular del serogrupo C *N.meningitidis* (MenC) es un homopolímero de ácido siálico ( $\alpha$  2 $\rightarrow$ 9) ligado, con variable O-acetilación en las posiciones 7 y/o 8. El sacárido de serogrupo W135 *N.meningitidis* es un polímero que tiene unidades disacáridas de ácido siálico-galactosa [ $\rightarrow$ 4)-D-Neup5Ac(7/90Ac)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ )]. Tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [33]. El serogrupo *N.meningitidis* Y sacárido es similar al serogrupo W135 sacárido, excepto que la unidad disacárida de repetición 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.

[0019] Preferiblemente, los sacáridos antígenos proceden de GBS, serotipos Ia, Ib y/o III. También se prefieren los sacáridos antígenos de otros serotipos GBS, por ejemplo serotipos II, IV, V, VI, VII y/o VIII. En concreto, el antígeno sacárido podría ser el sacárido capsular *Streptococcus agalactiae* a partir de esos

serotipos, que está unido de forma covalente a los residuos GlcNAc del eje central del peptidoglicano de la bacteria. Los polisacáridos capsulares de diferentes serotipos están relacionados químicamente, pero son muy diferentes antigénicamente. Todos los polisacáridos capsulares GBS comparten el siguiente núcleo trisacárido:



5 [0020] Los diferentes serotipos GBS difieren en la forma en la que se modifica su núcleo. La diferencia entre los serotipos Ia y III, por ejemplo, surge del uso de GlcNAc (Ia) o de Gal (III) en su núcleo para unir núcleos trisacáridos consecutivos (Figura 1). Tanto los serotipos Ia como Ib tienen un disacárido [ $\alpha\text{-D-NeupNAc}(2\rightarrow3)\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow)}$ ] unido a GlcNAc en el núcleo, pero la unión será 1 $\rightarrow$ 4 (Ia) o 1 $\rightarrow$ 3 (Ib).

10 [0021] La enfermedad relacionada con GBS surge principalmente a partir de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, y VIII, y más del 90 % es causada por cinco serotipos: Ia, Ib, II, III y V. El invento usa preferentemente un sacárido a partir de uno de esos cinco serotipos. Tal y como se muestra en la Figura 2, los sacáridos capsulares de cada uno de esos cinco serotipos incluyen: (a) un residuo de ácido terminal *N*-acetil-neuramínico (NeuNAc) (normalmente se le llama ácido siálico), que en todos los casos está unido 2 $\rightarrow$ 3 a un residuo de galactosa; y (b) un residuo de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) dentro del núcleo trisacárido.

15 [0022] La proteína portadora podría estar conjugada a una mezcla de sacáridos antígenos como se describe en la referencia 34. La proteína portadora podría estar conjugada a una especie única de sacárido o podría estar conjugada a varias especies diferentes de sacáridos. En este invento, las proteínas portadoras se conjugan preferiblemente con 2, 3, 4 o más diferentes antígenos sacáridos. Los antígenos podrían proceder del mismo patógeno o de patógenos diferenciados antigénicamente.

20 [0023] Así, la proteína portadora podría ser monovalente si cada molécula portadora de proteína está conjugada con sacáridos a partir de un único serogrupo bacteriano, o podría ser multivalente si dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más) sacáridos antigénicamente diferenciados estuviesen conjugados a la misma molécula portadora de proteína (por ejemplo, ver la referencia 34).

25 [0024] Preferiblemente, los compuestos del invento incluirán sacáridos antígenos a partir de un serogrupo de compuestos *N. meningitidis*, por ejemplo los compuestos pueden incluir sacáridos conjugados a partir de serogrupos A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. Los mejores compuestos incluyen sacáridos de los serogrupos C y Y. Otros de los mejores compuestos incluyen sacáridos de los serogrupos C, W135 y Y. Algunos compuestos todavía mejores incluyen sacáridos a partir de los serogrupos A, C, W135 y Y.

30 [0025] En otras combinaciones, la proteína portadora podría estar conjugada a un sacárido Hib conjugado y un sacárido a partir de al menos un serogrupo de *N. meningitidis*, preferiblemente a partir de más de un serogrupo de *N. meningitidis*. Por ejemplo, una proteína portadora podría estar conjugada a un sacárido Hib y sacáridos a partir de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) serogrupos *N. meningitidis* A, C, W135 y Y. También se indican otras combinaciones de sacáridos a partir de los patógenos anteriormente mencionados.

#### 40 **Preparación de sacáridos de antígeno capsular**

[0026] Los métodos para la preparación de sacáridos de antígeno capsular son muy conocidos. Por ejemplo, la ref. 35 describe la preparación de sacáridos antígenos a partir de *N. meningitidis*. La preparación de sacáridos antígenos a partir de *Hinfluenzae* se describe en el capítulo 14 de la ref. 36. La preparación de sacáridos antígenos y conjugados a partir de *S. pneumoniae* está ya descrita. Por ejemplo, Prevenar™ es una vacuna conjugada de 7-valente pneumocócica. Los procesos para la preparación de sacáridos antígenos a partir de *S. agalactiae* se describen en detalle en las referencias 37, 38 y 39. Los mejores procesos para la preparación de sacáridos antígenos a partir de *S. agalactiae* se describen en la referencia 40. Los sacáridos capsulares pueden purificarse por medio de técnicas conocidas, tal y como se describe en varias referencias contenidas en el presente documento.

45 [0027] Los sacáridos antígenos podrían modificarse químicamente. Por ejemplo, podrían modificarse para sustituir uno o más grupos hidroxilos con grupos de bloqueo. Esto es especialmente útil para el serogrupo meningocócico A en el que los grupos de acetilo podrían sustituirse con grupos de bloqueo para evitar la hidrólisis [41]. Dichos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos de serogrupo A dentro del significado del presente invento.

50 [0028] En concreto, el antígeno sacárido de GBS podría modificarse. Por ejemplo, cuando el antígeno sacárido sea el serotipo V *Streptococcus agalactiae* sacárido capsular, el antígeno sacárido podría modificarse de la forma que se describe en la ref. 42. En concreto, el serotipo V *Streptococcus agalactiae* de sacárido capsular podría ser desialilado (Figura 3). El sacárido capsular desialilado GBS de serotipo V podría prepararse tratando el sacárido capsular de GBS purificado serotipo V en condiciones levemente ácidas (por ejemplo, 0,1M de ácido sulfúrico a 80° C durante 60 minutos) o por tratamiento con neuraminidasa, tal y como

se describe en la referencia 42. Uno de los mejores métodos para la preparación de sacárido capsular desialilado GBS de serotipo V es tratando el sacárido purificado con 1M de ácido acético a 81° C +/-3° C durante 2 horas.

5 **[0029]** El sacárido podría modificarse químicamente en relación con el sacárido capsular de la forma en que se encuentra naturalmente. Por ejemplo, el sacárido podría ser des-O-acetilado (parcial o totalmente), des-N-acetilado (parcial o totalmente), N-propionilado (parcial o totalmente), etc. La desacetilación podría darse antes, durante o después de la conjugación, pero preferiblemente se da antes de la conjugación. Dependiendo del sacárido concreto, la desacetilación podría afectar o no a la inmunogenicidad, por ejemplo, la vacuna  
10 NeisVac-C™ utiliza un sacárido des-O-acetilado, mientras que Menjugate™ está acetilado, pero las dos vacunas son eficaces. El efecto de la desacetilación puede evaluarse por medio de pruebas rutinarias.

15 **[0030]** Los sacáridos capsulares podrían usarse en la forma de oligosacáridos. Se forman oportunamente por medio de la fragmentación de polisacáridos capsulares purificados (por ejemplo, por hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado. La fragmentación de polisacáridos se lleva a cabo preferiblemente para dar un grado medio final de polimerización (DP) del oligosacárido de menos de 30. DP puede medirse por medio de cromatografía de intercambio de iones o por pruebas colorimétricas [43].

20 **[0031]** Si se lleva a cabo la hidrólisis, el hidrolisato generalmente se medirá para retirar los oligosacáridos de corta longitud [44]. Puede conseguirse de varias maneras, como la ultrafiltración seguida de cromatografía por intercambio de iones. Los oligosacáridos que tienen un grado de polimerización de menos o iguales a aproximadamente 6 se retiran preferentemente para el meningococo del serogrupo A, y los de menos de aproximadamente 4 preferiblemente se retiran para los serogrupos W135 y Y.

## 25 **Conjugados de sacárido portador**

**[0032]** Los conjugados purificados por el método del invento podrían incluir pequeñas cantidades de portador libre (por ejemplo, no conjugados). Cuando haya presente una determinada proteína portadora tanto en forma libre como conjugada en una composición a continuación de la purificación por el método del invento, la forma no conjugada preferiblemente no será mayor del 5 % de la cantidad total de la proteína portadora en el compuesto en conjunto (por peso), y todavía mejor, estará presente en menos del 2 %, o mejor en menos del 1 %, o mejor todavía menos del 0,5 %.

35 **[0033]** Los conjugados con una proporción sacárido:proteína (w/w) de entre el 1:5 (por ejemplo, proteína en exceso) y 5:1 (por ejemplo, sacárido en exceso) podrían purificarse con el método del invento. Por ejemplo, proporciones entre 1:2 y 5:1 y proporciones entre 1:1.25 y 1:2.5. Tal y como se describe en la referencia 45, diferentes conjugados de serogrupo meningocócico de una mezcla pueden tener una proporción sacárido:proteína diferente, por ejemplo, uno podría tener una proporción de entre 1:2 y 1:5, mientras otro tiene una proporción entre 5:1 y 1:1,99.

40 **[0034]** Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligando adecuado donde sea necesario. La unión del antígeno sacárido al portador se realiza preferiblemente a través de un grupo -NH<sub>2</sub>, por ejemplo en la cadena lateral de un residuo de lisina en una proteína portadora, o un residuo de arginina. Cuando un sacárido tenga un grupo aldehído libre, puede reaccionar con una amina del portador para formar un conjugado por medio de aminación reductiva. La unión también podría ser a través de un grupo -SH por ejemplo  
45 en la cadena lateral de un residuo de cisteína.

**[0035]** El sacárido normalmente se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación podría implicar, por ejemplo, reactivos cianiladores como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato 1-ciano-4-dimetilamino piridinio [46, 47, etc.]). Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU (ver también la introducción a la referencia 48).

50 **[0036]** Cuando el antígeno sacárido sea un sacárido capsular *Streptococcus agalactiae*, la conjugación normalmente implica la aminación del sacárido a una proteína portadora, tal y como se describe en la referencia 37. La aminación reductiva implica un grupo de amina en la cadena lateral de un aminoácido en el portador y un grupo de aldehído en el sacárido. Ya que los sacáridos capsulares GBS no incluyen un grupo de aldehído en su forma natural, se genera antes de la conjugación por oxidación de periodato de una parte de los residuos del ácido siálico del sacárido, tal y como se muestra en la Figura 4 [37,49]. La conjugación de un sacárido capsular *Streptococcus agalactiae* a una proteína portadora también podría llevarse a cabo utilizando los métodos que se describen en la referencia 50.

60 **[0037]** Tal y como se describe en la referencia 51, una mezcla de conjugados podría incluir un conjugado con unión directa sacárido/proteína y otro conjugado con unión a través de un ligando. Esta distribución se aplica concretamente cuando se utilizan conjugados sacáridos a partir de serogrupos meningocócicos diferentes, por ejemplo los sacáridos MenA y MenC podrían conjugarse por medio de un ligando, mientras que los sacáridos

MenW135 y MenY podrían conjugarse directamente a una proteína portadora. Dichos conjugados podrían purificarse por el método del invento.

- 5 **[0038]** La concentración de portador (conjugados y no-conjugados) a partir de cada conjugado podría ser de no más de 100µg/ml, por ejemplo <30µg/ml de proteína portadora a partir de cada conjugado. Algunos compuestos incluyen una concentración total de portador de menos de 500µg/ml, por ejemplo <400µg/ml, <300µg/ml, <200µg/ml, <100µg/ml, <50µg/ml, etc.

Ligandos

- 10 **[0039]** Las uniones por medio de un grupo ligando podrían realizarse utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos que se describen en las referencias 52 y 53. Un tipo de unión implica la aminación reductiva del sacárido, acoplado el amino grupo resultante con un extremo de un grupo ligante de ácido adípico, y a continuación acoplado la proteína portadora al otro extremo del grupo ligante de ácido adípico [54, 55]. Otros ligantes incluyen B-propionamido [56], nitrofenil-etilamina [57], halogenuros de haloacil [58], uniones glicosídicas [59], ácido 6-aminocaproico [60], ADH [61], fracciones de C4 a C12 [62] etc. Como alternativa al uso de un ligando, puede usarse la unión directa. Las uniones directas a la proteína podrían incluir la oxidación del polisacárido seguida de aminación reductiva con la proteína, tal y como se describe en las referencias 63 y 64, por ejemplo.

- 20 **[0040]** Se prefiere un proceso que implique la introducción de amino grupos en el sacárido (por ejemplo, sustituyendo grupos =O terminales con -NH<sub>2</sub>) seguida de la derivación con un diéster adípico (por ejemplo, diéster de ácido adípico N-hidroxisuccinimido) y la reacción con proteína portadora.

- 25 **[0041]** Podría usarse un ligando bifuncional para proporcionar un primer grupo para acoplarlo con un grupo de amina en el sacárido y un segundo grupo para acoplar con el portador (normalmente, para acoplar a una amina del portador). El primer grupo del ligando bifuncional es así capaz de reaccionar con un grupo de amina (-NH<sub>2</sub>) del sacárido. Esta reacción normalmente implicará una sustitución electrofílica del hidrógeno de la amina. El segundo grupo del ligando bifuncional es capaz de reaccionar con un grupo de amina del portador. Esta reacción normalmente implicará una sustitución electrofílica de la amina.

- 30 **[0042]** Donde las reacciones tanto con el sacárido como con el portador impliquen las aminas, se preferirá el uso de un ligando bifuncional de la fórmula X-L-X, donde: los dos grupos X sean iguales y puedan reaccionar con las aminas; y donde L es una fracción ligante en el ligando. Un grupo X preferible es N-oxisuccinimida. L preferiblemente tiene la fórmula L'-L<sup>2</sup>-L', donde L' es carbonilo. Los grupos de L<sup>2</sup> preferibles son alquilos de cadena lineal con entre 1 y 10 átomos de carbono (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<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-.

- 35 **[0043]** Otros grupos de X son aquellos que forman ésteres cuando estén en combinación con HO-L-OH, como norborano, ácido p-nitrobenzoico, y sulfo-N-hidroxisuccinimida.

- 40 **[0044]** Otros ligandos bifuncionales para su uso con el invento incluyen halogenuros de acrilolil (por ejemplo, cloruro) y haloacilhalogenuros.

**[0045]** El ligando se añadirá en exceso molar al sacárido modificado, en general.

- 45 **[0046]** Tras la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay varios métodos adecuados, incluida la cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, la diafiltración, etc. [ver también las refs. 65 y 66, etc.].

**[0047]** Donde el compuesto del invento incluya un sacárido despolimerizado, se prefiere que la despolimerización preceda a la conjugación.

#### 50 *Hidroxiapatita*

**[0048]** La hidroxiapatita ((Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH)<sub>2</sub>) que se utiliza en el invento podría estar en una de las varias técnicas conocidas en este ámbito. La hidroxiapatita podría ser en forma de cristal, un gel o una resina. La forma cristalina normal podría también sintetizarse a altas temperaturas para modificarla a forma cerámica (Bio-Rad).

- 55 **[0049]** Preferiblemente, la hidroxiapatita se usará en forma de gel. Preferiblemente, el gel se mostrará en forma de columna, tal y como se utiliza habitualmente en la purificación por cromatografía.

- 60 **[0050]** Si la hidroxiapatita estuviese en forma particulada, las partículas preferiblemente tendrían un diámetro de 20 µm o más, preferiblemente 40 µm o más, preferiblemente 80 µm o más.

**[0051]** Preferiblemente, la hidroxiapatita tendrá una capacidad de unión dinámica de >10 mg de lisozima por gramo (por ejemplo, 12,5, 15, 17,5, 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 35, 40, 45, 50 o más).

**pH**

[0052] Preferiblemente, el método se lleva a cabo a un pH de entre 6 y 8, mejor si es entre 6.5 y 7.5, y mejor todavía a 7.2. Se prefiere pH 7.2 porque ayuda a garantizar la estabilidad del sacárido. El pH puede ajustarse utilizando ácidos/bases conocidos.

**5 Concentración de fosfato**

10 [0053] Las diferentes concentraciones de fosfato que se utilizan en este método pueden tener un efecto sobre el funcionamiento del conjugado a partir de la reacción. Preferiblemente, la concentración de fosfato del material de inicio y el equilibrado/carga tras el lavado es de 50mM o menos (por ejemplo, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 o menos). Normalmente, se utiliza una concentración de 35mM. Los niveles más elevados de concentración podrían tener como resultado la inhibición de la unión por la hidroxiapatita.

[0054] Normalmente, se utiliza un tampón de fosfato de sodio.

**Otros antígenos**

15 [0055] Tal y como se ha indicado, los conjugados purificados por medio del invento podrían formularse como compuestos farmacéuticos por medio de la adición de un diluyente aceptable farmacológicamente o un portador. Dichos compuestos podrían también incluir uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) antígenos diferentes, como:

**A. Antígenos bacterianos**

20 [0056] *Neisseria meningitidis*: los antígenos meningocócicos podrían incluir proteínas (como las identificadas en las referencias 67-73), sacáridos (incluido un polisacárido, oligosacárido o lipopolisacárido), o vesículas de la membrana exterior [74-77] purificadas o derivadas de un serogrupo *N.meningitidis* como el A, C, W135, Y, y/o B. Los antígenos de proteína meningocócica podrían seleccionarse a partir de adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro y proteínas asociadas a la membrana (preferiblemente, proteínas integrantes de la membrana externa). Ver también las referencias 78-86.

25 [0057] *Streptococcus pneumoniae*: Los antígenos de *S.pneumoniae* podrían incluir un sacárido (incluido un polisacárido o un oligosacárido) y/o proteína procedente de *S.pneumoniae*. Los antígenos de proteínas podrían seleccionarse, por ejemplo, a partir de una proteína identificada en cualquiera de las refs. 87-92. Las proteínas de *S.pneumoniae* podrían seleccionarse a partir de la familia Tríada Poli Histidina (PhtX), la familia de Proteínas de Unión por Colina (CbpX), truncados CbpX, familia LytX, truncados LytX, proteínas químicas truncadas de CbpX LytX truncado, pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 o Sp133. Ver también las refs. 93-99.

30 [0058] *Streptococcus pyogenes* (Estreptococo del Grupo A Streptococcus): Los antígenos de Estreptococos del Grupo A podrían incluir una proteína identificada en la referencia 100 o 101 (incluido GAS40), fusiones o fragmentos de proteínas GAS M (incluidas las descritas en las refs. 102-104), proteína de unión por fibronectina (Sfb1), proteína Estreptocócica heme-asociada (Shp), y Estreptolisina S (SagA). Ver también las refs. 100, 105 y 106.

35 [0059] *Moraxella catarrhalis*: Los antígenos de moraxella incluyen los antígenos identificados en las refs. 107 y 108, antígenos de la proteína de la membrana exterior (HMW-OMP), antígeno-C, y/o LPS. Ver también las refs. 109.

40 [0060] *Bordetella tos ferina*: Los antígenos de la tos ferina incluyen la holotextina de tos ferina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) a partir de *B.tos ferina*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos antígenos 2 y 3. Ver también las refs. 110 y 111.

45 [0061] *Staphylococcus aureus*: Los antígenos *S.aureus* incluyen polisacáridos capsulares *S. aureus* tipo 5 y 8 opcionalmente conjugados con exotoxina *Pseudomonas aeruginosa* no tóxica recombinante A, como StaphVAX™, o antígenos derivados a partir de proteínas de superficie, invasinas (leukocidina, kinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben la exposición fagocítica (cápsula, Proteína A), carotenoides, producción de catalasa, Proteína A, coagulasa, factor de coagulación, y/o toxinas dañinas para la membrana (opcionalmente destoxificadas) que lisan las membranas de las células eucarióticas (hemolisinas, leucotoxina, leukocidina). Ver también la ref. 112.

50 [0062] *Clostridium tetani* (tétanos): Los antígenos del tétanos incluyen el toxoide del tétanos (TT), preferiblemente utilizado como proteína portadora en conjunción/conjugados con los compuestos del presente invento.

- 5 **[0063]** *Corynebacterium diphtheriae* (Difteria): Los antígenos de la difteria incluyen la toxina de la difteria o mutantes destoxificados de las mismas, como CRM197. Además, los antígenos capaces de modular, inhibir o asociados con la ribosilación de ADP se contemplan para la combinación/coadministración/conjugación con los compuestos del presente invento. Estos antígenos de difteria podrían usarse como proteínas portadoras.
- 10 **[0064]** *Haemophilus influenzae*: Los antígenos de *H.influenzae* incluyen un antígeno sacárido del tipo B, o la proteína D [24].
- 15 **[0065]** *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo del Grupo B): Los antígenos del Estreptococo del Grupo B incluyen antígenos de proteínas identificados en las refs. 100 y 113-116. Por ejemplo, los antígenos incluyen las proteínas GBS80, GBS104, GBS276 y GBS322.
- 20 **[0066]** *Neisseria gonorrhoea*: Los antígenos gonocócicos incluyen la proteína Por (o porina), como PorB [117], una proteína de unión por transferencia, como TbpA y TbpB [118], una proteína de opacidad (como Opa), una proteína modificable por reducción (Rmp), y preparados de vesícula de membrana externa (OMV) [119]. Ver también las refs. 67-69 y 120.
- 25 **[0067]** *Chlamydia trachomatis*: Los antígenos *C.trachomatis* incluyen los 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 con Linfogranuloma venéreo), y serotipos, D-K. Los antígenos *C.trachomatis* también podrían incluir un antígeno identificado en las refs. 116 y 121-123, incluido PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), DnaK (CT396), CT398, OmpH-like (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823), y MurG (CT761). Ver también la ref. 124.
- 30 **[0068]** *Salmonella typhi* (fiebre tifoide): Los antígenos incluyen polisacáridos capsulares, preferiblemente conjugados (Vi, por ejemplo vax-TyVi).

#### B. Antígenos virales

- 35 **[0069]** *Orthomyxovirus*: Los antígenos virales podrían derivarse de un Orthomyxovirus, como Gripe A, B y C. Los antígenos Orthomyxovirus podrían seleccionarse a partir de una o más de las proteínas virales, incluida la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA), la nucleoproteína (NP), la proteína de matriz (M1), la proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de la transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los mejores antígenos incluyen HA y NA.
- 40 **[0070]** Los antígenos de Gripe podrían derivarse de cepas de la gripe interpandémica (anual). Alternativamente, los antígenos de gripe pueden derivarse de cepas con el potencial para causar un brote pandémico (por ejemplo, cepas de gripe con nueva hemaglutinina comparada con la hemaglutinina de las cepas que están en circulación, o las cepas de gripe son patógenas en sujetos aviares y tienen potencial para transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de gripe que son patógenas para los humanos).
- 45 **[0071]** *Paramyxoviridae* virus: Los antígenos virales podrían derivarse de virus de Paramyxoviridae, como los Pneumovirus (RSV), Paramixovirus (PIV) y Morbillivirus (Sarampión). [125-127].
- 50 **[0072]** *Pneumovirus*: Los antígenos virales podrían derivarse de un Pneumovirus, como el virus Respiratorio sincicial (RSV), virus sincicial respiratorio bovino, virus de la neumonía del ratón y virus de rinotraqueitis del pavo. Preferiblemente, el Pneumovirus es RSV. Los antígenos de neumovirus podrían seleccionarse a partir de una o más de las siguientes proteínas, incluida la fusión de proteínas de superficie (F), Glicoproteína (G) y proteína pequeña hidrofóbica (SH), proteínas de matriz M y M2, proteínas nucleocápsidas N, P y L y proteínas no estructurales NS1 y NS2. Los mejores antígenos de Pneumovirus incluyen F, G y M. Ver, por ejemplo, la ref. 128. Los antígenos de neumovirus podrían también ser formulados en o derivados de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos RSV/PIV podrían incluir componentes tanto de RSV como de PIV.
- 55 **[0073]** *Paramyxovirus*: Los antígenos virales podrían derivarse de un Paramixovirus, como los virus Paragripales tipo 1 - 4 (PIV), Paperas, virus de Sendai, virus simio 5, virus paragripal bovino y virus de la enfermedad de Newcastle. Preferiblemente, el Paramyxovirus es PIV o Paperas. Los antígenos de Paramixovirus pueden elegirse a partir 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 mejores proteínas de Paramixovirus incluyen HN, F1 y F2. Los antígenos de Paramixovirus podrían formularse en o derivados a partir de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus RSV/PIV quiméricos podrían incluir componentes de tanto RSV como PIV. Las vacunas de paperas disponibles comercialmente incluyen el virus vivo atenuado de las paperas, en forma monovalente o en combinación con vacunas de sarampión o rubéola (MMR).
- 60 **[0074]** *Morbillivirus*: Los antígenos virales pueden derivarse a partir de un Morbillivirus, como Sarampión. Los antígenos Morbillivirus podrían seleccionarse a partir de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina

(H), Glicoproteína (G), Factor de fusión (F), proteína grande (L), Nucleoproteína (NP), Fosfoproteína de polimerasa (P), y Matriz (M). Las vacunas de sarampión disponibles comercialmente incluyen el virus del sarampión en vivo atenuado, normalmente en combinación con paperas y rubeola (MMR).

5 **[0075] Enterovirus:** Los antígenos virales podrían derivarse de un Enterovirus, como Poliovirus tipos 1, 2 o 3, virus de Coxsackie A tipos de 1 a 22 y 24, virus de Coxsackie B tipos de 1 a 6, Ecovirus (ECHO) virus) tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 y Enterovirus 68 a 71. Preferiblemente, el Enterovirus es un poliovirus. Los antígenos de enterovirus son seleccionados preferiblemente a partir de una o más de las siguientes proteínas Cápside VP1, VP2, VP3 y VP4. Las vacunas de la polio disponibles comercialmente incluyen la Vacuna Inactivada de la Polio  
10 (IPV) y la vacuna del poliovirus oral (OPV).

**[0076] Heparnavirus:** Los antígenos virales podrían derivarse de un Heparnavirus, como el virus de la Hepatitis A (HAV). Las vacunas de HAV disponibles comercialmente incluyen la vacuna inactivada HAV. [129, 130].  
15

**[0077] Togavirus:** Los antígenos virales podrían derivarse de un Togavirus, como un Rubivirus, un Alfavirus, o un Arterivirus. Se prefieren los antígenos derivados del Rubivirus, como el virus Rubéola. Los antígenos de togavirus podrían seleccionarse a partir de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 o NSP-4. Los antígenos de togavirus se seleccionan preferiblemente a partir de E1, E2 o E3. Las vacunas de la Rubéola disponibles comercialmente incluyen un virus vivo adaptado al frío, normalmente en combinación con las vacunas de paperas y sarampión (MMR).  
20

**[0078] Hepadnavirus:** Los antígenos virales podrían derivarse de un Hepadnavirus, como el virus de la Hepatitis B. Los antígenos de Hepadnavirus podrían seleccionarse a partir de antígenos de superficie (L, M y S), antígenos de núcleo (HBc, HBe). Las vacunas de HBV disponibles comercialmente incluyen vacunas de subunidad que incluyen la proteína del antígeno S de superficie [130,131].  
25

**[0079] Papovaviruses:** Los antígenos podrían derivarse de Papovavirus, como los Virus del Papiloma y Poliomavirus. Los Virus del Papiloma incluyen serotipos HPV 1,2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41,42, 47, 51, 57, 58, 63 y 65. Preferiblemente, los antígenos HPV se derivan de los serotipos 6, 11, 16 o 18. Los antígenos HPV podrían seleccionarse a partir de proteínas cápside (L1) y (L2), o E1 - E7, o fusiones de las mismas fusiones. Los antígenos de HPV preferiblemente se formulan en partículas semejantes a los virus (VLPs). Los virus de Poliomiavirus incluyen el virus BK y el virus JK. Los antígenos Poliomavirus podrían seleccionarse a partir de VP1, VP2 o VP3.  
30

### 35 C. Formulaciones de antígenos

**[0080]** En otros aspectos del invento se presentan métodos para producir micropartículas que han adsorbido antígenos. Los métodos incluyen: (a) proporcionar una emulsión dispersando una mezcla que incluya (i) agua, (ii) un detergente, (iii) un disolvente orgánico, y (iv) un polímero biodegradable seleccionado a partir del grupo que consta de un ácido poli( $\alpha$ -hidroxi), un ácido polihidroxi butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido, y un policianoacrilato. El polímero normalmente está presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 30 % en relación con el solvente orgánico, mientras el detergente está normalmente presente en la mezcla en una proporción peso-a-peso detergente-a-polímero de entre aproximadamente 0.00001:1 a aproximadamente 0.1:1 (más habitualmente entre aproximadamente 0.0001:1 a aproximadamente 0.1:1, de aproximadamente 0.001:1 a aproximadamente 0.1:1, o entre aproximadamente 0.005:1 y aproximadamente 0.1:1); (b) retirar el disolvente orgánico de la emulsión; y (c) adsorber un antígeno en la superficie de las micropartículas. En determinadas representaciones, el polímero biodegradable está presente en una concentración de entre aproximadamente el 3 % hasta aproximadamente el 10 % en relación con el disolvente orgánico.  
40  
45

**[0081]** Las micropartículas para su presente uso se formarán a partir de materiales que son esterilizables, no-tóxicos y biodegradables. Dichos materiales incluyen, entre otros, ácido poli( $\alpha$ -hidroxi), ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, poliortoéster, polianhídrido, PACA, y policianoacrilato. Preferiblemente, las micropartículas para su uso con el presente invento se derivan de un ácido poli( $\alpha$ -hidroxi), en concreto, a partir de un poli(láctido) ("PLA") o un copolímero de D,L-láctido y ácido glicólico o glicólico, como poli(D,L-láctido-co-glicólico) ("PLG" o "PLGA"), o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Las micropartículas podrían derivarse de cualquiera de los varios materiales de inicio polimérico que tienen varios pesos moleculares y, en el caso de copolímeros como PLG, varias proporciones láctido:glicólico, cuya selección será principalmente cuestión de preferencia, dependiendo en parte de la macromolécula coadministrada. Estos parámetros se tratarán más detalladamente más adelante.  
50  
55

### 60 **Métodos médicos y usos**

**[0082]** Una vez formulados, los compuestos del invento podrían administrarse directamente a un sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en concreto, podrán tratarse sujetos humanos. Los compuestos podrían

formularse como vacunas especialmente útiles para vacunar a niños y adolescentes. Podrían administrarse por vías sistémicas y/o mucosas.

5 [0083] Normalmente, los compuestos se preparan en forma inyectable, ya sea en forma de solución líquida o suspensión; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en o suspensión en  
10 vehículos líquidos antes de su inyección. La administración directa de los compuestos será generalmente por vía parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o administrada al espacio intersicial de un tejido). Los compuestos también pueden administrarse sobre una lesión. Otras formas de administración incluyen la oral y pulmonar, supositorios y aplicación transdérmica o transcutánea (por ejemplo, véase la ref. 132), agujas e hiposprays. La dosificación del tratamiento podría basarse en un calendario de dosis única o de dosis múltiples (por ejemplo, las dosis de refuerzo).

15 [0084] Las vacunas del invento son preferiblemente estériles y libres de pirógeno. Preferiblemente se tamponan, por ejemplo entre pH 6 y pH 8, normalmente alrededor de pH 7. Cuando una vacuna incluya una sal de aluminio hidróxido, se prefiere el uso de un tampón de histidina [133].

20 [0085] Las vacunas del invento podrían incluir detergente (por ejemplo, un Tween, como Tween 80) a niveles bajos (por ejemplo, <0.01 %). Las vacunas del invento podrían incluir un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o trehalosa, por ejemplo, a unos 15 mg/ml, especialmente si van a estar o han estado liofilizadas.

25 [0086] Las dosis óptimas de antígenos individuales pueden evaluarse de forma empírica. De todas formas, en general, los antígenos conjugados purificados por el método del invento se administrarán a una dosis de entre 0,1 y 100 µg de cada sacárido por dosis, con un volumen normal de dosificación de 0,5 ml. La dosis está normalmente entre 5 y 20 µg por sacárido por dosis. Estos valores se miden por sacárido en el conjugado.

30 [0087] Las vacunas que se preparan de acuerdo con el invento podrían ser profilácticas (por ejemplo, para evitar la infección) o terapéuticas (por ejemplo, para tratar la enfermedad tras la infección), pero normalmente serán profilácticas.

35 [0088] El invento proporciona un conjugado purificado por medio del método del invento para su uso en medicina.

40 [0089] La presentación también incluye un conjugado de acuerdo con el invento para su uso en un método para provocar una respuesta inmune en un paciente, que incluye la administración al paciente de un conjugado de acuerdo con el invento. La respuesta inmune será preferiblemente protectora contra la enfermedad meningocócica, enfermedad pneumocócica o *H. influenzae* tipo B y podría incluir una respuesta inmune humoral y/o una respuesta inmune celular. Los pacientes serán preferentemente niños. El método podría provocar una respuesta de amplificación en un paciente que ya haya sido preparado contra meningococo, neumococo o *H. influenzae* tipo B. En otras representaciones, la respuesta inmune es protectora contra *Streptococcus agalactiae* y podría incluir una respuesta inmune humoral y/o una respuesta celular inmune. Los pacientes serán preferentemente niños, neonatos o adultas embarazadas. El método podría provocar una respuesta amplificadora en pacientes que hayan sido preparados previamente contra el *Streptococcus agalactiae*.

45 [0090] La presentación también incluye el uso de un conjugado del invento en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en los pacientes, donde dichos pacientes hayan sido tratados previamente con un antígeno sacárido diferente al incluido en los conjugados del compuesto a un portador.

50 [0091] El invento también permite el uso de un conjugado en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un paciente, donde dicho paciente haya sido tratado previamente con el mismo antígeno sacárido como los incluidos en los conjugados del compuesto a un portador diferente.

55 [0092] El medicamento es preferiblemente un compuesto inmunogénico (por ejemplo, una vacuna). El medicamento es preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, gonorrea etc.), por *H. influenzae* (por ejemplo, otitis media, bronquitis, neumonía, celulitis, pericarditis, meningitis etc.) o por neumococo (por ejemplo, meningitis, sepsis, neumonía, etc). Por lo tanto, se prefiere la prevención y/o tratamiento de meningitis bacteriana. En otras representaciones, el medicamento es para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por *Streptococcus agalactiae*. Por lo tanto, se prefiere la prevención y/o tratamiento de dichas enfermedades.

60 [0093] Las vacunas pueden probarse en modelos animales estándar (por ejemplo, ver la ref. 134).

#### Adyuvantes

[0094] Podrían administrarse conjugados del invento conjuntamente con otros agentes inmunoreguladores. En concreto, las composiciones normalmente incluirán un adyuvante. Los adyuvantes que pueden usarse en los

compuestos del invento incluyen, entre otros:

*A. Compuestos que contienen minerales*

5 **[0095]** Los compuestos que contienen minerales adecuados para su uso como adyuvantes en el invento incluyen sales minerales, como sales de aluminio y sales de calcio. Dichos compuestos minerales podrían incluir sales minerales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 135], o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante hidróxido, opcionalmente con exceso del fosfato), con los compuestos en cualquier forma adecuada (por ejemplo en gel, cristalina, amorfa, etc.), y con adsorción a la(s) sal(es) como forma preferible. Los compuestos que contienen minerales podrían también formularse como partícula de sal metálica [136].

10 **[0096]** Las sales de aluminio podrían incluirse en compuestos del invento de forma que la dosis de  $Al^{3+}$  esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

15 **[0097]** Un adyuvante de fosfato de aluminio habitual es el hidrofosfato de aluminio amorfo con una relación de proporción molar  $PO_4/Al$  entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg  $Al^{3+}/ml$ . La adsorción con una baja dosificación de fosfato de aluminio podría utilizarse, por ejemplo, entre 50 y 100  $\mu g Al^{3+}$  por conjugado por dosis. Cuando se use un fosfato de aluminio y se desee que no adsorba un antígeno al adyuvante, esto se favorece incluyendo iones libres de fosfato en una solución (por ejemplo, por medio del uso de un tampón de fosfato).

20 *B. Emulsiones de aceite*

25 **[0098]** Los compuestos de emulsión de aceite adecuados para su uso como adyuvantes con conjugados del invento incluyen emulsiones de escualeno-agua, como MF59 (5 % Escualeno, 0,5 % Tween 80, y 0,5 % Span 85, formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador) [Capítulo 10 de la ref. 135; ver también las refs. 137-139]. MF59 se utiliza como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente FLUAD™ del virus de la gripe. La emulsión de MF59 incluye favorablemente iones de citrato, por ejemplo un tampón de citrato de sodio de 10mM.

30 **[0099]** Los adyuvantes que se consideran mejores para su uso en los compuestos son las emulsiones submicrónicas aceite-agua. Las mejores emulsiones de submicrón aceite-agua para su uso presente son emulsiones de escualeno/agua que podrían contener cantidades variables de MTP-PE, como podría ser una emulsión de submicrón aceite-agua que contenga 4-5 % w/v de escualeno, 0,25-1,0 % w/v Tween 80 (polioxytilenesorbitan monooleato), y/o 0,25-1,0 % Span 85 (trioleato de sorbitan), y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isogluatminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE). Las emulsiones de submicrón aceite-agua, los métodos para fabricarlas y los agentes inmunoestimulantes, como los péptidos de muramil, para su uso en los compuestos, se describen en detalle en las referencias 137 y 140-141.

40 **[00100]** Puede usarse una emulsión de escualeno, un tocoferol y Tween 80. La emulsión podría incluir salino con tampón de fosfato. Podría también incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones podrían tener entre 2 y 10 % de escualeno, entre 2 y 10 % de tocoferol y entre 0,3 y 3 % de Tween 80, y la relación de peso de escualeno:tocoferol será preferiblemente de  $\leq 1$ , ya que proporciona una emulsión más estable. Una de dichas emulsiones puede realizarse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución del 2 %, mezclar 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml escualeno), y a continuación microfluidizar la mezcla. La emulsión resultante podría tener gotas submicrométricas de aceite, por ejemplo con un diámetro medio de entre 100 y 250nm, preferiblemente de aproximadamente 180nm.

45 **[00101]** Puede utilizarse una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100).

50 **[00102]** Puede usarse una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en salino con tampón fosfato, pH 7.4. Esta emulsión es un vehículo útil para dipéptidos de muramil, y se ha utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [142] (0,05-1 % Thr-MDP, 5 % escualano, 2,5 % Plurónico L121 y 0,2 % polisorbato 80). También puede utilizarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [143] (5 % escualano, 1,25 % Plurónico L121 y 0,2 % polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

55 **[00103]** También podrían usarse como adyuvantes el adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA).

*C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 135]*

60 **[00104]** Las formulaciones de saponina también podrían utilizarse como adyuvantes de conjugados del invento. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esteroles y glicósidos de triterpenoide que se encuentran

en la corteza, las hojas, troncos, las raíces e incluso en las flores de una amplia variedad de especies vegetales. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officianalis* (flor del jabón). Las formulaciones de saponina adyuvante incluyen formulaciones purificadas, como QS21, así como formulaciones lípidas, como ISCOMs. QS21 se comercializa con el nombre de Stimulon™.

**[00105]** Las composiciones de saponina se han purificado utilizando HPLC y RP-HPLC. Las fracciones específicas purificadas utilizando estas técnicas se han identificado, incluidas QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina será QS21. En la ref. 144 se presenta un método de producción de QS21. Las formulaciones de saponina también pueden incluir un esteroles, como el colesterol [145].

**[00106]** Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimuladores (ISCOMs) [capítulo 23 de la ref. 135]. Los ISCOMs normalmente también incluyen un fosfolípido, como la fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOMs puede utilizarse cualquier saponina conocida. Preferiblemente, el ISCOM incluirá una o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen más detalladamente en las refs. 145-147. Opcionalmente, los ISCOMs podrían estar desprovistos de detergente(s) adicional(es) [148].

**[00107]** En las refs. 149 y 150 puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina.

#### D. *Virosomas y partículas semejantes a virus*

**[00108]** Los virosomas y las partículas semejantes a virus (VLPs) también pueden utilizarse como adyuvantes en el invento. Estas estructuras normalmente contienen una o más proteínas de un virus combinadas opcionalmente o formuladas con un fosfolípido. Generalmente son no-patógenas, no-replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse de los virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLPs incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (como HA o NA), virus de la Hepatitis B (como proteínas de núcleo cápsides), virus de la Hepatitis E, virus del sarampión, virus de Sindbis, Rotavirus, virus de la fiebre aftosa, Retrovirus, virus de Norwalk, virus del Papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago de Q $\beta$  (como proteínas de cubierta), fago de GA, fago fr, fago AP205, y Ty (como la proteína p1 de retrotransposon Ty). Los VLPs se explican más detalladamente en las refs. 151-156. Los virosomas se explican más detalladamente en, por ejemplo, ref. 157.

#### E. *Derivados bacterianos o microbianos*

**[00109]** Entre los adyuvantes adecuados para su uso en el invento, se incluyen derivados bacterianos o microbianos como los derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados de Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ADP-ribosilintés y derivados destoxificados de ellos.

**[00110]** Los derivados no tóxicos de LPS incluyen lípido A (MPL) monofosforilo y MPL 3-O-desacilato

**[00111]** (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de 3 lípido monofosforil de-O-acilato A con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma mejor de "pequeña partícula" de lípido monofosforil 3 De-O-acilato A se presenta en la ref. 158. Dichas "pequeñas partículas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para filtrarse de forma estéril a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m [158]. Otros derivados no tóxicos de LPS incluyen imitaciones de lípido monofosforil A, como derivados de fosfato aminoalquil glucosamínido, por ejemplo RC-529 [159, 160].

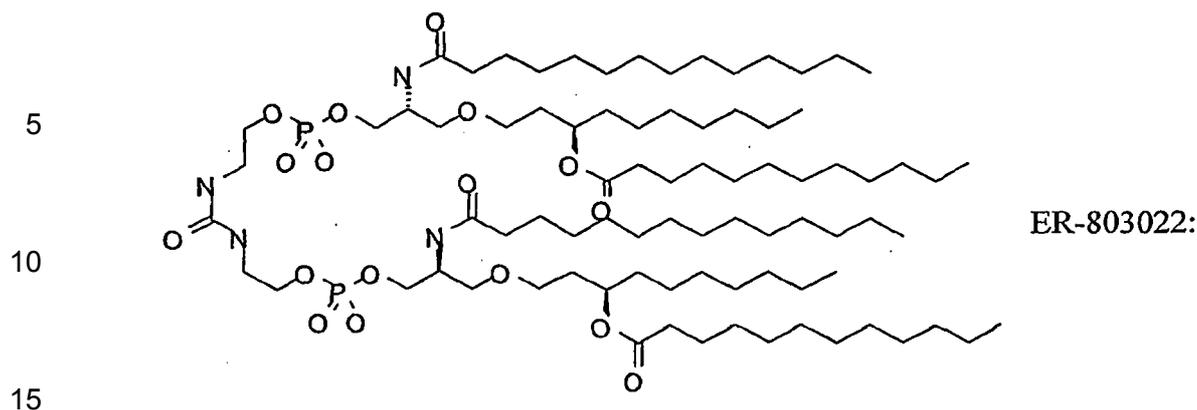
**[00112]** Entre los derivados de Lípido A se incluyen derivados del lípido A a partir de *Escherichia coli*, como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 161 y 162.

**[00113]** Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en el invento incluyen secuencias de nucleótidos que contengan un motivo CpG (una secuencia dinucleótida que contiene una citosina no-metilada unida a un fosfato ligado a una guanina). Los ARNs de doble cadena y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también se ha demostrado que son inmunoestimuladores.

**[00114]** Los CpGs pueden incluir modificaciones/análogos nucleótidos como modificaciones de fosforotioato y pueden tener doble cadena o cadena única. Las referencias 163, 164 y 165 presentan posibles sustituciones análogas, por ejemplo la sustitución de guanina con 2'-desoxi-7-deazaguanina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se explica más detalladamente en las refs. 166-171.

**[00115]** La secuencia de CpG podría dirigirse a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCGTT [172]. La secuencia CpG podría ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, como un ODN CpG-A, o podría ser más





F. *Inmunomoduladores humanos*

[00119] Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en el invento incluyen citocinas, como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [191], IL-23, IL-27 [192] etc.) [193], interferones (por ejemplo, interferón- $\gamma$ ), factor estimulador de colonia macrófaga, factor de necrosis tumoral y proteína inflamatoria -1 alfa (MIP-1alfa) y MIP- 1beta [194].

20

G. *Bioadhesivos y Mucoadhesivos*

[00120] Los bioadhesivos y mucoadhesivos también pueden usarse como adyuvantes en el invento. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [195] o mucoadhesivos como derivados reticulados de ácido poli(acrílico), alcohol polivinilo, pirlidona polivinilo, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y sus derivados también pueden utilizarse como adyuvantes en el invento [196].

25

H. *Micropartículas*

[00121] Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en el invento. Las micropartículas (por ejemplo, una partícula de ~100nm a ~ 150 $\mu$ m de diámetro, más preferiblemente ~200nm a ~30 $\mu$ m de diámetro, y el mejor de ~500nm a ~10 $\mu$ m de diámetro) formados de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un ácido poli( $\alpha$ -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, un policaprolactono, etc.), con poli(láctido-co-glicólido) son preferibles, opcionalmente tratados para que tengan una superficie de carga negativa (por ejemplo, con SDS) o una superficie con carga positiva (por ejemplo, con un detergente catiónico, como CTAB).

30

I. *Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 135)*

[00122] En las refs. 197-199 se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes.

J. *Formulaciones de éter polioxietileno y éster polioxietileno*

[00123] Entre los adyuvantes adecuados para su uso en el invento se incluyen los éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [200]. Dichas formulaciones también incluyen surfactantes de éster de sorbitán de polioxietileno en combinación con un octoxinol [201] así como éteres de alquil polioxietileno o surfactantes de éster en combinación con por lo menos un surfactante adicional no iónico como un octoxinol [202]. Los mejores éteres de polioxietileno se seleccionan a partir del siguiente grupo: éter polioxietileno-9-lauril (laureth 9), éter polioxietileno-9-esteoril, éter polioxietileno-8-esteoril, éter polioxietileno-4-lauril éter, éter polioxietileno-35-lauril, y éter polioxietileno-23-lauril.

40

45

K. *Polifosfazene (PCPP)*

[00124] Se describen formulaciones de PCPP (poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazene]), por ejemplo, en las refs. 203 y 204.

L. *Péptidos de muramilo*

[00125] Entre los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados susceptibles de ser utilizados como adyuvantes

en el invento se incluyen N-acetilo-muramilo-L-treonilo-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilo-normuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramilo-1,-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina MTP-PE).

M. *Compuestos de imidazoquinolona.*

5 [00126] Entre los ejemplos de los compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en el invento se incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descrito más detalladamente en las refs. 205 y 206.

N. *Compuestos de tiosemicarbazona.*

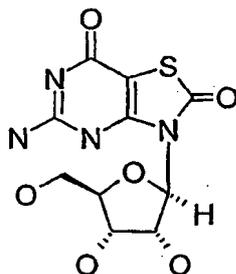
10 [00127] Entre los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como métodos para formular, fabricar e investigar compuestos adecuados para su uso como adyuvantes en el invento se incluyen los descritos en la ref. 207. Los tiosemicarbazonos son especialmente eficaces en la estimulación de células mononucleares humanas periféricas de la sangre para la producción de citocinas, como TNF- $\alpha$ .

O. *Compuestos de tripantrina.*

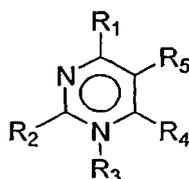
15 [00128] Entre los ejemplos de compuestos de tripantrina, así como ejemplos de formulación, fabricación e investigación para los compuestos adecuados para su uso como adyuvantes en el invento se incluyen los descritos en la ref. 208. Los compuestos de tripantrina son especialmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de la sangre periféricas humanas para la producción de citocinas, como TNF- $\alpha$ .

P. *Análogos nucleósidos*

20 [00129] Varios análogos nucleósidos pueden usarse como adyuvantes, como (a) Isatorabine (ANA-245; 7-tia-8-oxo-guano-sin):



y profármacos de los mismos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos presentados en las referencias 209 a 211; (f) un compuesto con la fórmula:

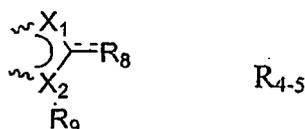


donde:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente H, halo, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -OH, alcoxí C<sub>1-6</sub>, alcoxí C<sub>1-6</sub> sustituido, heterociclil, heterociclil sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, alquil C<sub>1-6</sub>, o alquil C<sub>1-6</sub> sustituido;

35 R<sub>3</sub> está ausente, H, alquil C<sub>1-6</sub>, alquil C<sub>1-6</sub> sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, heterociclil, o heterociclil sustituido;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son mutuamente independientes H, halo, heterociclil, heterociclil sustituido, -C(O)-R<sub>d</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>, alquil C<sub>1-6</sub> sustituido, o unido conjuntamente para formar un anillo de 5 miembros como en R<sub>4-5</sub>:

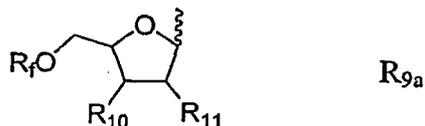


la unión se consigue en los puntos indicados con 

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son mutuamente independientes N, C, O, o S;

5 R<sub>8</sub> es H, halo, -OH, alquil C<sub>1-6</sub>, alquenil C<sub>2-6</sub>, alquinil 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-(alquil C<sub>1-6</sub>), -S(O)<sub>p</sub>R<sub>e</sub>, o -C(O)-R<sub>d</sub>;

R<sub>9</sub> es H, alquil C<sub>1-6</sub> alquil, alquil C<sub>1-6</sub> sustituido, heterocicliil, heterocicliil sustituido o R<sub>9a</sub>, donde R<sub>9a</sub> es:



la unión se consigue en el punto indicado con 

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

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

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

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

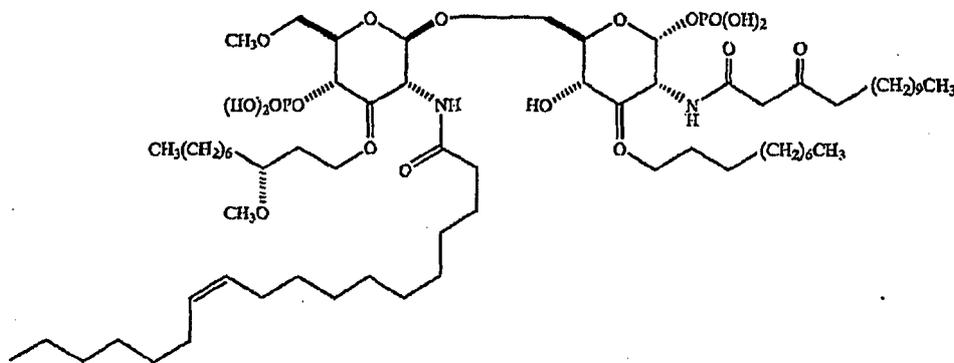
15 cada R<sub>e</sub> es independientemente H, alquil C<sub>1-6</sub>, alquil C<sub>1-6</sub> sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, heterocicliil, o heterocicliil sustituido;

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, o 3; cada p es independientemente 0, 1, o 2; o

20 o (g) una sal aceptable farmacológicamente de cualquiera de entre (a) y (f), un tautómero de cualquiera entre (a) y (f), o una sal aceptable farmacológicamente del tautómero.

Q. *Lípidos unidos a un fosfato-con eje central acíclico*

[00130] Entre los adyuvantes que contienen lípidos unidos a un fosfato con eje central acíclico se incluye el TLR4 antagonista E5564 [212, 213]:



25

R. *Inmunopotenciadores de pequeñas moléculas (SMIPs)*

[00131] Los SMIPs incluyen:

- N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetilo-1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-etilo-N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-N2-propilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 5 • 1-(2-metilpropilo)-N2-propilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butilo-1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-butilo-N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-N2-pentilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-N2-prop-2-enilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 10 • 1-(2-metilpropilo)-2-[(fenilmetilo)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina;
- 1-(2-metilpropilo)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina;
- 1-[[4-amino-1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2-il](metil)amino]etanol; 2-[[4-amino-1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2-il](metil)amino]etil acetato; 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dehidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolina-2-ona; N2-butilo-1-(2-metilpropilo)-N4,N4-bis(fenilmetilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina; N2-butilo-N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-N4,N4-bis(fenilmetilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina; N2-metilo-1-(2-metilpropilo)-N4,N4-bis(fenilmetilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 15 • N2,N2-dimetilo-1-(2-metilpropilo)-N4,N4-bis(fenilmetilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina;
- 1-{4-amino-2-[metilo(propilo)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-il}-2-metilpropano-2-ol;
- 1-{4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-il}-2-metilpropano-2-ol;
- 20 • N4,N4-dibenzilo-1-(2-metoxi-2-metilpropilo)-N2-propilo-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina.

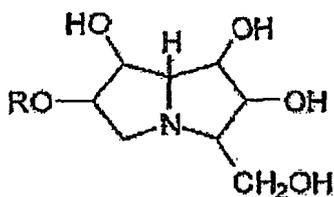
S. *Proteosomas*

- [00132] Un adyuvante es una preparación de proteosoma de la membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con un preparado de liposacárido derivado de una segunda bacteria Gram-negativa, donde la proteosoma de proteína de la membrana externa y las preparaciones del liposacárido forman un complejo adyuvante estable no-covalente. Dichos complejos incluyen "IVX-908", un complejo que incluye la membrana exterior de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Se han utilizado como adyuvantes para las vacunas de la gripe [214].
- 25

T. *Otros adyuvantes*

- [00133] Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se presentan en las referencias 135 y 215. Otras sustancias adyuvantes útiles pueden ser:
- 30

- Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [216].
- Un compuesto polihidroxilado de pirolizidina [217], como uno que tenga la fórmula:



donde R se selecciona a partir del grupo que incluye hidrógeno, puro o ramificado, alquil no sustituido o sustituido, saturado o insaturado, alquil (por ejemplo, cicloalquil), alquenil, alquinil y grupos de arilo, o una sal aceptable farmacológicamente o un derivado. Entre los ejemplos se incluyen, entre otros: casuarina, casuarina-6- $\alpha$ -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-di-*epi*-casuarina, etc.

- 5 • Una gamma inulina [218] o un derivado de la misma, como la algamulina.
- Los compuestos presentados en la referencia 219.
- Los compuestos presentados en la referencia 220, incluidos: compuestos de Acilpiperazina, compuestos de Indolediona, compuestos de Tetrahid-raisoquinolina (THIQ), compuestos de Benzociclodiona, compuestos de Aminoazavinilo, compuestos de quinolina Aminobenzimidazola (ABIQ) [221, 222], compuestos de Hidraptalamida, compuestos de Benzofenona, compuestos de Isoxazola, compuestos de Esterol, compuestos de Quinazolinona, compuestos de Pirrol [223], compuestos de Antraquinona, compuestos de Quinoxalina, compuestos de Triazina, Pirazalopirimidina, y compuestos de Benzazol [224].
- 10 • Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [225].

15 **[00134]** Se prefiere una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (normalmente neutral), como aminopropilo-dimetilo-miristoleiloxi-propanaminio bromido-difitanoilfosfatidilo-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropilo-dimetilo-bis-dodeci-loxi-propanaminio bromida-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren las formulaciones que contienen sales ( $\pm$ )-N-(3-aminopropilo)-N,N-dimetilo-2,3-bis(sin-9-tetradeceneiloxi)-1-propanaminio [226].

20 **[00135]** El invento podría también incluir combinaciones de aspectos de uno o más aspectos de uno o más de los adyuvantes que se han identificado anteriormente. Por ejemplo, las siguientes combinaciones podrían utilizarse como compuestos adyuvantes en el invento: (1) una saponina y una emulsión aceite-agua [227]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [228]; (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 + a esterol) [229]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones aceite-agua [230]; (6) SAF, que contengan 10 % de escualano, 0,4 % de Tween 80™, 5 % de polímero L121 de bloque plurónico, y tr-MDP, ya sea nucrofluidizado en una emulsión de submicrón o agitado en vórtex para generar una emulsión de partículas de mayor tamaño. El sistema de adyuvante (7) Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) con 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de paredes celulares bacterianas del grupo que incluye monofosforilípido A (MPL), dimicolato trehalosa (TDM), y esqueleto de paredes celulares (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como 3dMPL); y (9) una o más sales minerales (como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulador (como una secuencia nucleotídica que incluya un motivo CpG).

25

30

### 35 **Definiciones**

**[00136]** El término "incluyen" implica también "constar de". Por ejemplo, un compuesto "que incluya" X podría constar únicamente de X o podría incluir algún elemento adicional, como por ejemplo X + Y.

40 **[00137]** El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10$  %. Todos los valores numéricos que se incluyen en este documento pueden considerarse de esta forma, a no ser que el contexto indique lo contrario.

45 **[00138]** La palabra "sustancialmente" no excluye a "completamente" por ejemplo, un compuesto que esté "sustancialmente libre" de Y podría estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" podría omitirse de la definición del invento.

### **DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DISEÑOS**

**[00139]**

50 La Figura 1 muestra la diferencia entre las estructuras que se repiten en los serotipos GBS Ia y III.

La Figura 2 muestra la repetición de las estructuras de sacáridos capsulares de los serotipos GBS Ia, Ib, II, III y V.

55 La Figura 3 muestra la repetición de la estructura de la forma desialilada del polisacárido capsular a partir del serotipo GBS V. La Figura 4 muestra la oxidación periodatal de un residuo terminal de ácido siálico.

Las Figuras 5 y 6 muestran la página SDS con una purificación de conjugado con hidroxiapatita del tipo I y el tipo II, respectivamente. Clave de la columna: 1-CRM, 3-conjugado crudo, 5-fluido (conjugado), 7-Eluado (CRM no-conjugados).

5 Las Figuras 7 y 8 muestran una salida de HPLC para la hidroxiapatita del tipo I y tipo II, respectivamente. El primer pico es de los conjugados CRM197-GBS Tipo III, el segundo pico es de los CRM197 no-conjugados.

## MODOS PARA LLEVAR A CABO EL INVENTO

### EJEMPLO 1

10

#### **Preparación del conjugado**

15

[00140] Polisacáridos de purificado capsular a partir de serotipos *Streptococcus agalactiae* Ia, Ib y III se conjugaron a una proteína portadora por oxidación por periodato seguida de animación reductora. La proteína portadora fue CRM197.

#### **Comparación de purificación por ultrafiltración contra purificación por hidroxiapatita**

20

25

[00141] Los conjugados se purificaron usando ultrafiltración (utilizando diafiltración de flujo tangencial con una membrana de 100KDa) o resina de hidroxiapatita (resinas de Tipo I o Tipo II de 80mm, Bio-Rad). La resina de tipo I HA tiene una mayor capacidad de unión de proteínas y una mayor capacidad para las proteínas ácidas, mientras que el Tipo II tiene una menor capacidad de unión de proteínas, pero mejor resolución de ciertas proteínas. CRM197 tiene un peso molecular de aproximadamente 60KDa. Mientras la ultrafiltración por medio de una membrana 100KDa podría separar los conjugados de polisacáridos de alto peso molecular (como conjugados de serotipo Ia de unos 150KDa, dando como resultado una masa total de conjugado de unos 210KDa) a partir de la mezcla de conjugado/no-conjugados CRM197, no se podría utilizar para conjugados de menor peso molecular (como conjugados del serotipo III) que no mostraron una diferencia suficiente en la masa molecular entre la proteína portadora conjugada y no-conjugada.

30

[00142] En contraste, los experimentos preliminares han mostrado que tanto la resina hidroxiapatita de Tipo I como del Tipo II podría utilizarse para purificar los conjugados de los no-conjugados CRM197. Los no-conjugados CRM197 se unieron a la resina mientras la proteína conjugada fue protegida por el sacárido conjugado y lo mismo se encontró en el fluido.

#### **Pruebas de varios parámetros para la purificación de hidroxiapatita**

35

##### *pH*

[00143] Normalmente se usa un pH de 6.8 para la cromatografía por hidroxiapatita. De todas formas, en este experimento se ha usado un pH de 7.2 para asegurar la estabilidad del sacárido. No se detectó ningún efecto sobre la eficacia de la cromatografía debido a este cambio del pH.

40

##### *Concentración de fosfato*

45

[00144] Se probaron diferentes concentraciones de fosfato para determinar el efecto sobre el rendimiento del purificado conjugado. Se llegó a la conclusión de que CRM197 une completamente la columna de hidroxiapatita si la concentración de fosfato es de  $\leq 35$ mM en el material de inicio y el tampón de equilibrado/lavado post carga (pH7.2). A esas concentraciones, los conjugados de CRM197-Ia/Ib siempre se recuperaron completamente en la columna de fluido, mientras que los conjugados CRM197-III se recuperaron con un rendimiento del 80-85 %.

##### *Volumen de lavado (después de la carga)*

50

[00145] Debido a alguna interacción con la hidroxiapatita, no todos los conjugados fluyeron inmediatamente a partir de la columna durante la carga. De todas formas, se descubrió que a una concentración de fosfato de 30mM, todos los conjugados fluyeron con un lavado post-carga de menos de 1,5 volúmenes de columna (CV). Así, el volumen de carga era de aproximadamente 0,6CV, los siguientes 0,4 a 2,2CV se recogieron e incluyeron en el conjugado.

##### *Carga de columna (capacidad)*

55

[00146] A una concentración de fosfato de 35mM, se llegó a la conclusión de que la hidroxiapatita pudo unir completamente CRM197 a una proporción de CRM total:volumen de columna de aproximadamente  $< 2.5$ mg CRM por ml de resina. Para reducir las posibilidades de que los no-conjugados CRM197 estén presentes en el

fluido, podría usarse un CRM menor:volumen de columna de aproximadamente 1,5mg CRM por ml de resina.

*Proceso piloto*

**[00147]** A continuación de estos experimentos, se estableció un proceso piloto de acuerdo con los siguientes parámetros:

5 Volumen de columna = 4 L (variación aceptable: > 3 L). La columna seleccionada tenía un diámetro de 20 cm (peso correspondiente de aproximadamente 11 ± 2,5 cm).

Enjuague y equilibrado de columna: 5 CV de 400 mM de fosfato de sodio con tampón de pH 6.8 a 80 cm/h (419 ml/min) más 5 CV de 35 mM fosfato de sodio tampón de pH 7.2 a 80 cm/h.

10 Carga de columna y recolección de producto: carga de producto (80 cm/h) y a continuación lavado con tampón de equilibrado; flujo de desperdicios de hasta 0,4 CV, se obtiene producto hasta 2,2 CV, a continuación desperdicios hasta 2,9 CV.

Columna eluida con 2 CV de fosfato de sodio de 400 mM de tampón pH 6.8 a 80 cm/h para recoger los conjugados CRM unidos a la columna (esta fracción no es relevante para el proceso).

**Comparación de hidroxiapatita de Tipo I con hidroxiapatita de Tipo II**

15 **[00148]** Se ha descubierto que las hidroxiapatitas de Tipo I y Tipo II purifican el conjugado a partir de la mezcla con el mismo nivel de eficacia. Las Figuras 5 y 6 muestran los geles SDS-page para el Tipo I y Tipo II, respectivamente. Estos geles claramente muestran que no se ha encontrado ningún CRM197 no conjugado en el flujo (panel 5). Tal y como se esperaba, el CRM197 no-conjugado se encontró en el eluado (panel 7). El material de inicio (mezcla de conjugados y no-conjugados CRM197), fluido y el eluado se analizó por SE-HPLC.

20 En las figuras 7 y 8 se muestran gráficos del proceso HPLC para el Tipo I y Tipo I, respectivamente. Cada una de las figuras muestra dos picos diferenciados que tienen relación con el conjugado purificado y los CRM197 no-conjugados. En la Figura 7, el doble pico corresponde al material de inicio, el primer pico es el fluido (conjugado purificado) y el segundo pico es el material eluido a partir de la resina (CRM197 no-conjugados). En la Figura 8, el primer pico es el fluido (conjugado purificado) y el segundo pico es el material eluido a partir de la resina (CRM197no-conjugados).

25

**EJEMPLO 2 Preparación de conjugado**

30 **[00149]** El polisacárido capsular desialilado purificado de *Streptococcus agalactiae* serotipo V se conjugó a una proteína portadora por oxidación de periodato seguida de una aminación reductiva. La proteína portadora fue CRM197.

**Prueba de parámetros de carga de columna para la purificación de hidroxiapatita**

*Carga de columna*

35 **[00150]** A una concentración de fosfato de 35mM, se descubrió que la hidroxiapatita podría unir completamente CRM197 a una proporción de CRM total:volumen de columna de aproximadamente <2.5 mg CRM por ml de resina. Para reducir las posibilidades de que los CRM197 no conjugados estén presentes en el fluido, podría usarse un CRM más bajo:volumen de columna de aproximadamente 1,5 mg CRM por ml de resina.

*Procesos de pruebas*

40 **[00151]** Durante este experimento, se establecieron varios procesos de pruebas utilizando los siguientes parámetros:

Parámetro	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Altura de columna (cm)	<u>5,5</u>	<u>12</u>	<u>12,75</u>	<u>12,75</u>
Diámetro de columna (cm)	<u>5</u>	<u>1,6</u>	<u>2,6</u>	<u>2,6</u>
Volumen de columna (cm)	<u>108</u>	<u>24</u>	<u>68</u>	<u>68</u>
Volumen cargado (ml)	<u>337</u>	<u>46</u>	<u>154</u>	<u>153</u>
Masa de CRM presente en la reacción de conjugación/volumen de columna (mg CRM por ml de resina)	<u>5,0</u>	<u>3,5</u>	<u>3,6</u>	<u>3,5</u>
Volumen de flujo (ml)	<u>750</u>	<u>95</u>	<u>270</u>	<u>245</u>
Volumen de eluato (ml)	<u>125</u>	<u>28</u>	<u>100</u>	<u>104</u>
0,2 µm de filtración de eluato	<u>No</u>	<u>Sí</u>	<u>Sí</u>	<u>Sí</u>

[0151] Los procesos de pruebas se analizaron de la siguiente manera:

Parámetro	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Concentración de proteína del fluido (µg/ml)	<u>564</u>	<u>691,1</u>	<u>755</u>	<u>789</u>
Concentración de proteína de eluado (µg/ml)	<u>816</u>	<u>474,4</u>	<u>342</u>	<u>245</u>
Concentración de sacárido del fluido (µg/ml)	<u>no detectado</u>	<u>832,52</u>	<u>1067,09</u>	<u>1166,29</u>
Concentración de sacárido de eluado (µg/ml)	<u>no detectado</u>	<u>159,78</u>	<u>92,35</u>	<u>65,35</u>
Estimación de % del conjugado en eluado (% del total de proteínas)	<u>11,2</u>	<u>no detectado</u>	<u>8,57</u>	<u>6,35</u>
CRM no conjugados en el fluido (% total proteínas)	<u>16 %</u>	<u>no detectado</u>	<u>no detectable</u>	<u>no detectable</u>

[0152] Los rendimientos para los procesos de pruebas se midieron como se indica a continuación:

Parámetro	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
CRM no-conjugados estimados en crudo (% por SE-HPLC)	<u>29,5</u>	<u>15,1</u>	<u>11,3</u>	<u>8,9</u>
Recuperación de proteínas en el fluido (% de CRM presente en una reacción de conjugación)	<u>78,3</u>	<u>77,8</u>	<u>84,5</u>	<u>68,2</u>
Recuperación de proteína en eluado (% de CRM presente en la reacción de conjugación)	<u>18,9</u>	<u>24,8</u>	<u>14,2</u>	<u>9,0</u>
Recuperación de sacárido en el fluido (% de Sacárido presente en la reacción de conjugación)	<u>no detectado</u>	<u>81,7</u>	<u>90,2</u>	<u>96,4</u>
Recuperación de sacárido en eluado (% de sacárido presente en la reacción de conjugación)	<u>no detectado</u>	<u>5,8</u>	<u>2,9</u>	<u>2,3</u>

5

[153] Estos datos muestran que la cromatografía de la hidroxiapatita permite la recuperación de más del 90 % del desialilado GBS tipo V de polisacáridos capsulares conjugados a CRM197 a partir de la mezcla. Aunque las pruebas dieron unos resultados de aproximadamente el 80 %, estas cifras hacen referencia a la cantidad total de CRM197 que estaba presente en la reacción de conjugación, 10-25 % de los cuales habría permanecido-no-conjugado antes de la carga en la resina de hidroxiapatita.

[154] El material de inicio (mezcla de CRM197conjugados y no-conjugados), fluido y eluado se analizó por SE-HPLC. A respecto del GBS tipo Ia, Ib y III, los conjugados explicados antes, se detectaron picos

diferenciados en relación con el purificado conjugado y los CRM197 no-conjugados. Este resultado muestra que la cromatografía de permite la retirada prácticamente completa de los CRM197 no-conjugados a partir del conjugado.

**[155] REFERENCIAS**

5

[1] Peltola (2000) Clin Microbiol Rev 13:302-317  
 [2] Wuorimaa & Kayhty (2002) Scand J Immunol 56:111-129  
 [3] Balmer et al. (2002) J Med Microbiol 51:717-722  
 [4] Alexander et al. (2000) J Immunol 164:1625-1633

10

[5] WO99/55730  
 [6] Lei et al. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.  
 [7] WO00/38711; US patent 6,146,902.  
 [8] WO94/06467.

15

[9] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.  
 [10] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.  
 [11] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.  
 [12] EP-A-0372501.

20

[13] EP-A-0378881.  
 [14] EP-A-0427347.  
 [15] WO93/17712  
 [16] WO94/03208.  
 [17] WO98/58668.  
 [18] EP-A-0471177.

25

[19] WO91/01146  
 [20] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.  
 [21] Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.  
 [22] EP-A-0594610.

30

[23] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.  
 [24] WO00/56360.  
 [25] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.  
 [26] WO02/091998.

35

[27] WO01/72337  
 [28] WO00/61761.  
 [29] WO02/34771  
 [30] WO03/093306  
 [31] WO04/041157  
 [32] WO2005002619  
 [33] WO2005/033148  
 [34] WO2006/067632

40

[35] WO03/007985  
 [36] Vaccine (ed Plotkin et al) Fourth Edition ISBN 0- 7216- 9688-0  
 [37] Wessels et al. (1990) J Clin Invest 86:1428-33.  
 [38] Wessels et al. (1989) Infect Immun 57:1089-94.  
 [39] WO2006/082527

45

[40] US patent application US 61/008,941, entitled "FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM" filed on 20th December 2007.

50

[41] WO03/080678  
 [42] WO2006/050341  
 [43] Ravenscroft et al. (1999) Vaccine 17:2802-2816.  
 [44] Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263.  
 [45] WO2007/000341.

55

[46] Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198.  
 [47] WO95/08348.  
 [48] WO98/42721  
 [49] US patent 4356170.

60

[50] WO2006/082530.  
 [51] WO2007/000342.  
 [52] US patent 4,882,317  
 [53] US patent 4,695,624  
 [54] Mol. Immunom., 1985, 22, 907-919

65

[55] EP-A-0208375  
 [56] WO00/10599  
 [57] Gevert et al., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).  
 [58] US patent 4,057,685.

- [59] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.  
 [60] US patent 4,459,286.  
 [61] US patent 4,965,338  
 [62] US patent 4,663,160.  
 5 [63] US patent 4,761,283  
 [64] US patent 4,356,170  
 [65] Lei et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.  
 [66] WO0/38711; US patent 6,146,902.  
 [67] WO99/24578  
 10 [68] WO99/36544  
 [69] WO99/57280  
 [70] WO00/22430.  
 [71] Tettelin et al. (2000) *Science* 287:1809-1815  
 [72] WO96/29412  
 15 [73] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820  
 [74] WO01/52885  
 [75] Bjune et al. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-96  
 [76] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.  
 [77] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol Stand.* 92:323-333.  
 20 [78] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.  
 [79] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.  
 [80] WO03/007985.  
 [81] WO00/66791  
 [82] WO01/64922  
 25 [83] WO01/64920  
 [84] WO03/020756  
 [85] WO2004/032958  
 [86] WO2004/048404.  
 [87] WO98/18931  
 30 [88] WO98/18930  
 [89] US Patent 6,699,703  
 [90] US Patent 6,800,744  
 [91] WO97/43303  
 [92] WO97/37026  
 35 [93] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.  
 [94] Rubin (2000) *Pediatr Clin Worth Am* 47:269-285, v.  
 [95] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.  
 [96] WO02/22167.  
 [97] Paoletti et al., (1990) *J Biol Chem* 265:18278-83.  
 40 [98] Wessels et al., (1990) *J Clin Invest* 86:1428-33.  
 [99] Baker et al., (2004) *J Infect Dis* 171:879-84.  
 [100] WO02/34771  
 [101] WO2005/032582  
 [102] WO02/094851  
 45 [103] Dale, *Vaccine* (1999) 17:193-200  
 [104] Dale, *Vaccine* 14(10): 944-948  
 [105] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.  
 [106] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.  
 [107] WO02/18595  
 50 [108] WO99/58562  
 [109] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.  
 [110] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.  
 [111] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.  
 [112] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219.  
 55 [113] WO03/093306  
 [114] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6  
 [115] WO2004/041157  
 [116] WO2005/002619  
 [117] Zhu et al., *Vaccine* (2004) 22:660 - 669  
 60 [118] Price et al., *Infection and Immunity* (2004) 71(1):277 - 283)  
 [119] Plante et al., *J Infectious Disease* (2000) 182:848 - 855)  
 [120] WO02/079243  
 [121] WO00/37494  
 [122] WO03/049762  
 65 [123] WO03/068811  
 [124] WO99/28475.  
 [125] Anderson (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S59-65.

- [126] Kahn (2000) *Curr Opin Pediatr* 12:257-262.  
 [127] Crowe (1995) *Vaccine* 13:415-421.  
 [128] *J Gen Virol*. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229  
 [129] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.  
 5 [130] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.  
 [131] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.  
 [132] WO98/20734.  
 [133] WO03/009869  
 [134] WO01/30390.  
 10 [135] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.  
 [136] WO00/23105.  
 [137] WO90/14837.  
 [138] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80.  
 [139] Frey et al. (2003) *Vaccine* 21:4234-7.  
 15 [140] US Patent 6,299,884.  
 [141] US Patent 6,451,325.  
 [142] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.  
 [143] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.  
 [144] US patent 5,057,540.  
 20 [145] WO96/33739.  
 [146] EP-A-0109942.  
 [147] WO96/11711.  
 [148] WO00/07621.  
 [149] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.  
 25 [150] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.  
 [151] Niikura et al. (2002) *Virology* 293:273-280.  
 [152] Lenz et al. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.  
 [153] Pinto et al. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.  
 [154] Gerber et al. (2001) *Virology* 75:4752-4760.  
 30 [155] WO03/024480  
 [156] WO03/024481  
 [157] Gluck et al. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.  
 [158] EP-A-0689454.  
 [159] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.  
 35 [160] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.  
 [161] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.  
 [162] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.  
 [163] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.  
 [164] WO02/26757.  
 40 [165] WO99/62923.  
 [166] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.  
 [167] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.  
 [168] WO98/40100.  
 [169] US patent 6,207,646.  
 45 [170] US patent 6,239,116.  
 [171] US patent 6,429,199.  
 [172] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.  
 [173] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.  
 [174] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.  
 50 [175] WO01/95935.  
 [176] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.  
 [177] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.  
 [178] WO03/035836.  
 [179] WO95/17211.  
 55 [180] WO98/42375.  
 [181] Beignon et al. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.  
 [182] Pizza et al. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.  
 [183] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.  
 [184] Scharton-Kersten et al. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.  
 60 [185] Ryan et al. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.  
 [186] Partidos et al. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.  
 [187] Peppoloni et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.  
 [188] Pine et al. (2002) *J Control Release* 85:263-270.  
 [189] Domenighini et al. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.  
 65 [190] WO03/011223.  
 [191] WO99/40936.  
 [192] Matsui M. et al. (2004) *J. Virol* 78: 9093.

[193] WO99/44636.  
 [194] Lillard JW et al., (2003) Blood Feb 1;101(3):807-14. Epub 2002 Sep 12.  
 [195] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.  
 [196] WO99/27960.  
 5 [197] US patent 6,090,406  
 [198] US patent 5,916,588  
 [199] EP-A-0626169.  
 [200] WO99/52549.  
 [201] WO01/21207.  
 10 [202] WO01/21152.  
 [203] Andrianov et al. (1998) Biomaterials 19:109-115.  
 [204] Payne et al. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.  
 [205] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.  
 [206] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.  
 15 [207] WO04/60308  
 [208] WO04/64759.  
 [209] US 6,924,271.  
 [210] US2005/0070556.  
 [211] US 5,658,731.  
 20 [212] Wong et al. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42.  
 [213] US2005/0215517.  
 [214] WO02/072012.  
 [215] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular  
 Medicine  
 25 series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.  
 [216] Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.  
 [217] WO2004/064715.  
 [218] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.  
 [219] WO2006/002422.  
 30 [220] WO2004/87153.  
 [221] US 6,605,617.  
 [222] WO02/18383.  
 [223] WO2004/018455.  
 [224] WO03/082272.  
 35 [225] US patent 5,011,828.  
 [226] US-6586409.  
 [227] WO99/11241.  
 [228] WO94/00153.  
 [229] WO98/57659.  
 40 [230] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.

45

50

55

60

65

## Reivindicaciones

1. Un método para purificar conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos a partir de una mezcla que incluye proteína de portador libre y conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos, y también podría incluir proteínas contaminantes, que incluye:
  - 5 el contacto de dicha mezcla con hidroxapatita de forma que la proteína portadora se una a la hidroxapatita mientras los conjugados no se unen; y la recolección de los conjugados libres de proteínas de sacáridos portadores de antígenos; donde el antígeno sacárido es un sacárido capsular bacteriano.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde la proteína portadora se selecciona a partir de toxoide del tétanos, toxoide de difteria, CRM197, proteínas de la membrana externa de *N.meningitidis*, proteínas sintéticas, proteínas de choque térmico, proteínas de tos ferina, citocinas, linfoquinas, hormonas, factores del crecimiento, portadores de poli-epitopo, proteína D de *H.influenzae*, pneumolisina, proteína PspA de la superficie neumocócica, proteínas de absorción de hierro, toxina A o B de *C.difficile* y/o un portador de poliepítopo como N19.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde dicha proteína portadora sea toxoide del tétanos; toxoide de difteria o CRM197.
4. El método de cualquier reivindicación anterior donde el antígeno sacárido tenga un peso molecular de 5kDa o más, preferiblemente 50kDa o más.
5. El método de cualquier reivindicación anterior donde el antígeno sacárido sea glicosilado.
- 20 6. El método de cualquier reivindicación anterior donde el antígeno sacárido proceda de *N.meningitidis*, *S.pneumoniae*, *S.agalactiae*, *H.influenzae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *Y.enterocolitica*, *V.cholerae* o *S.typhi*.
7. El método de la reivindicación 6 donde el antígeno sacárido proceda de los serotipos Ia, Ib, II, III & V de *S.agalactiae*.
- 25 8. El método de cualquier reivindicación anterior donde la proteína portadora se conjugue a los sacáridos antígenos a partir de una especie bacteriana o más de una.
9. El método de cualquier reivindicación anterior, donde el antígeno sacárido se conjugue a la proteína portadora por medio de un ligando.
- 30 10. El método de cualquier reivindicación anterior, donde dicho método se lleva a cabo a pH6.5-pH7.5, preferiblemente a pH7.2.
11. El método de cualquier reivindicación anterior donde dicho método se lleve a cabo a una concentración de fosfato de 50mM o menos.
12. El método de cualquier reivindicación anterior donde dicha hidroxapatita:
  - 35 (i) esté en forma de un gel,
  - (ii) tiene un tamaño de partícula de 40µm o más, y/o
  - (iii) tiene una capacidad dinámica de unión de >10mg lisozimas por gramo.
13. Un método para preparar un compuesto farmacéutico, que incluye el método de cualquier reivindicación anterior, y también incluye el paso iii) mezcla de dichos conjugados de proteínas de sacáridos portadores de antígenos obtenidos en el paso ii) con un diluyente o portador aceptable farmacológicamente.
- 40 14. El método de la reivindicación 13, además añadiendo el paso (iv) mezcla del producto del paso (iii) con un adyuvante.
15. El método de la reivindicación 13 o reivindicación 14, donde el compuesto incluya uno o más antígenos.

FIGURA 1

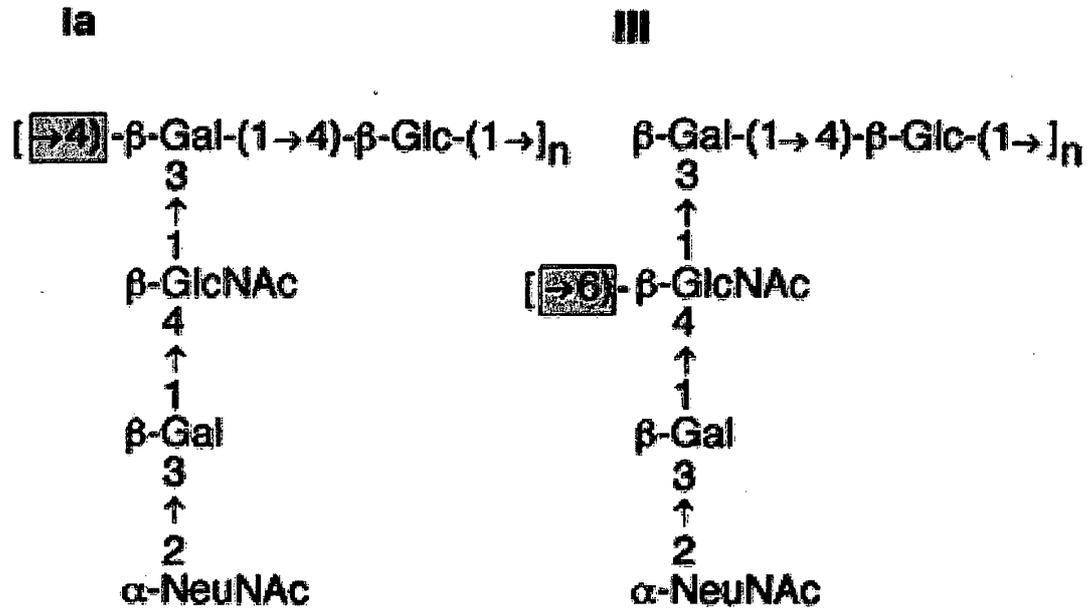


FIGURA 3

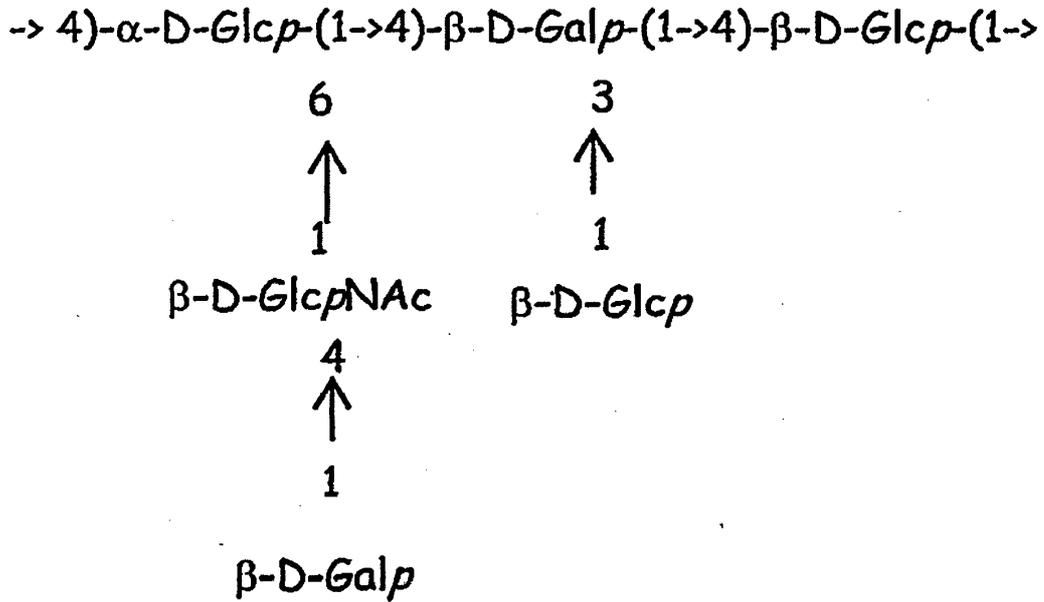


FIGURA 2

<p><b>IA</b></p> <p><math>[-\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)_n</math></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 1 <b><math>\beta\text{-D-GlcpNAc}</math></b></p> <p style="text-align: center;">4 ↑ 1 <b><math>\beta\text{-D-Galp}</math></b></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 2 <b><math>\alpha\text{-D-NeupNAc}</math></b></p>	<p><b>IB</b></p> <p><math>[-\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)_n</math></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 1 <b><math>\beta\text{-D-GlcpNAc}</math></b></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 1 <b><math>\beta\text{-D-Galp}</math></b></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 2 <b><math>\alpha\text{-D-NeupNAc}</math></b></p>
<p><b>II</b></p>	<p><math>[-\rightarrow 4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 2)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)_n</math></p> <p style="text-align: center;">6 ↑ 1 <b><math>\beta\text{-D-Galp}</math></b></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 2 <b><math>\alpha\text{-D-NeupNAc}</math></b></p>
<p><b>III</b></p>	<p><math>-\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow</math></p> <p style="text-align: center;">4 ↑ 1 <b><math>\beta\text{-D-Galp}</math></b></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 2 <b><math>\alpha\text{-D-NeupNAc}</math></b></p>
<p><b>V</b></p>	<p><math>-\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow</math></p> <p style="text-align: center;">6                      3 ↑                      ↑ 1                      1 <b><math>\beta\text{-D-GlcpNAc}</math></b>    <b><math>\beta\text{-D-Glcp}</math></b></p> <p style="text-align: center;">4 ↑ 1 <b><math>\beta\text{-D-Galp}</math></b></p> <p style="text-align: center;">3 ↑ 2 <b><math>\alpha\text{-D-NeupNAc}</math></b></p>

FIGURA 4

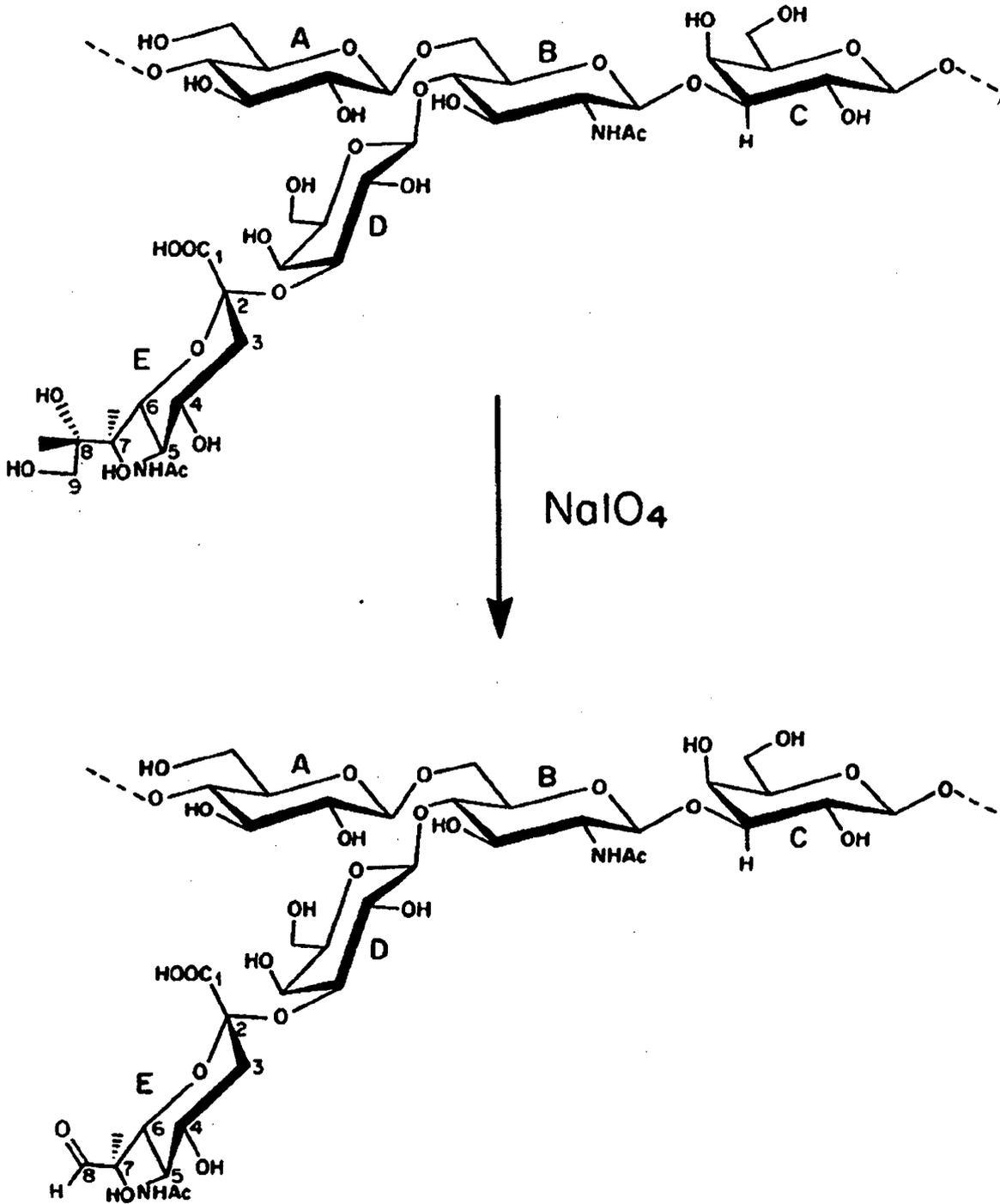


FIGURA 5

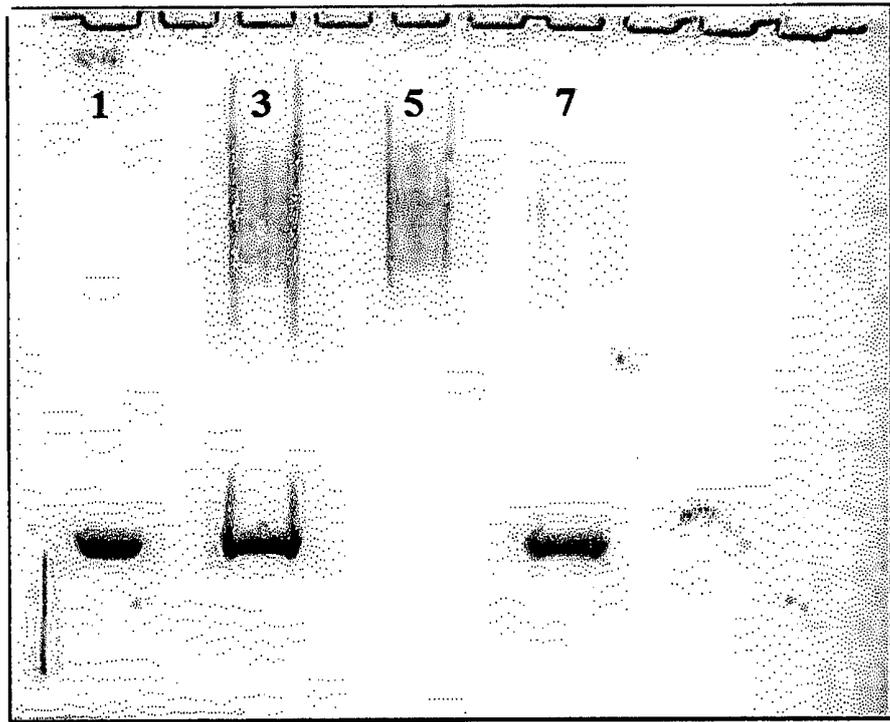


FIGURA 6

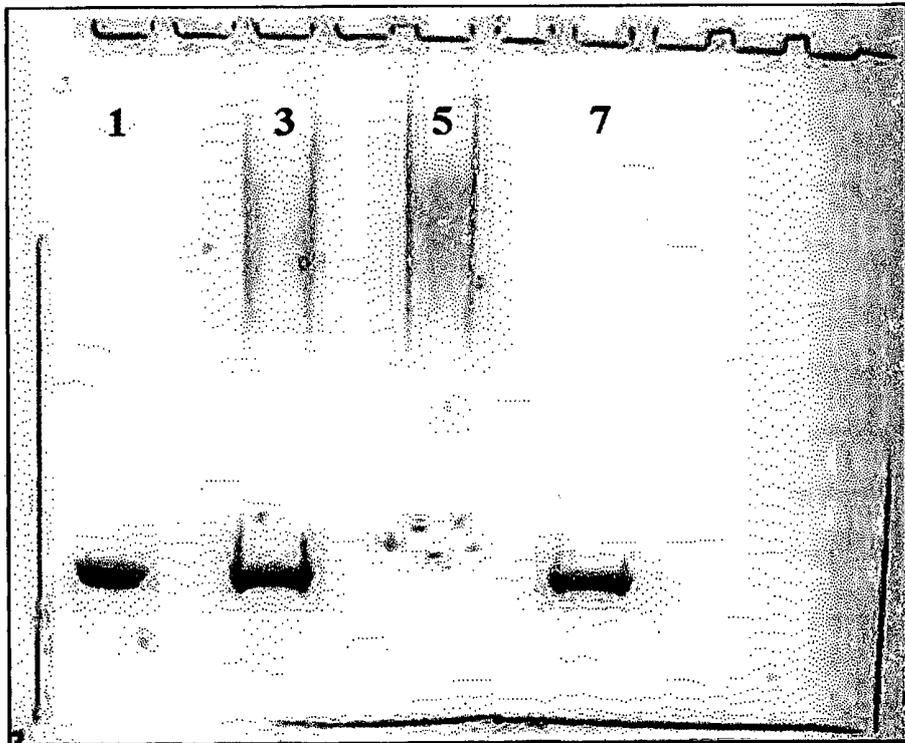


FIGURA 7

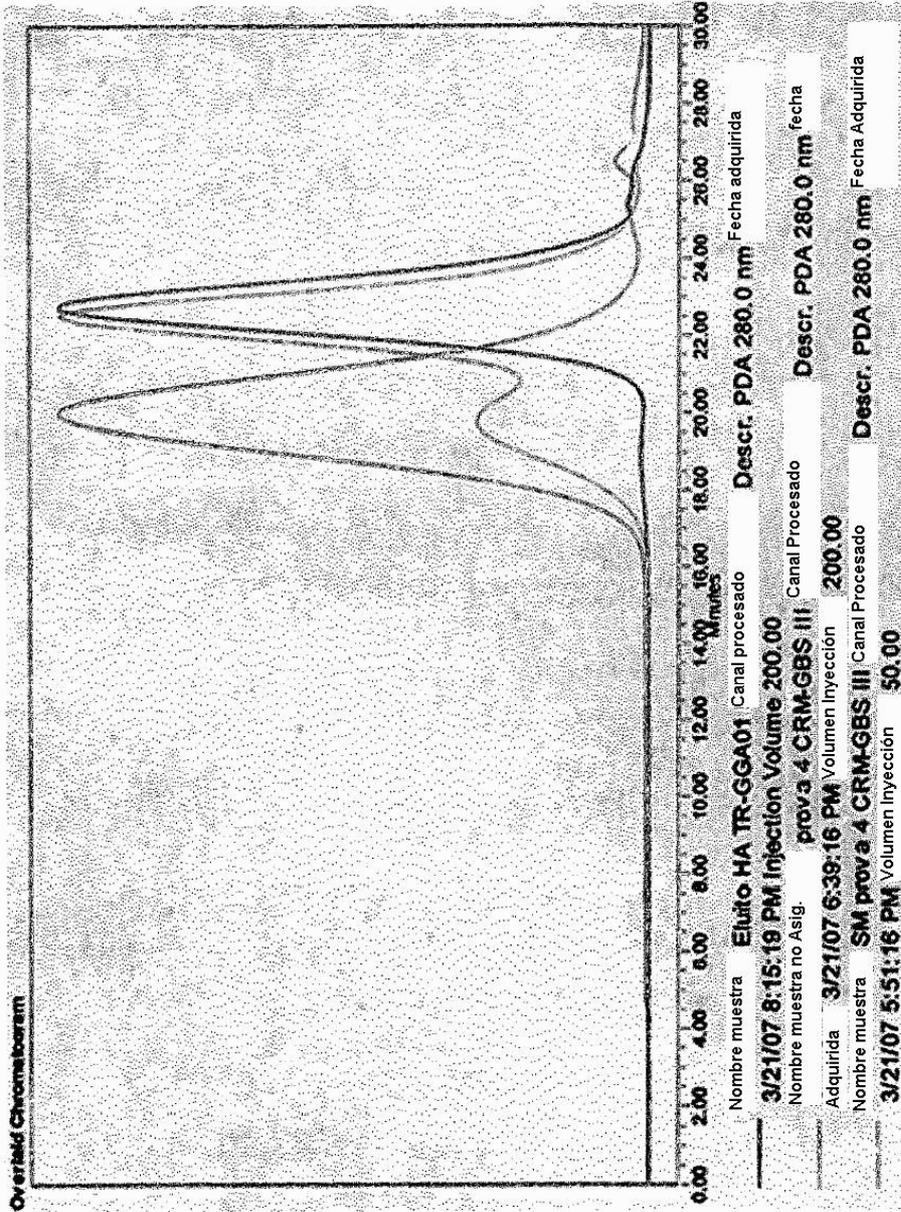


FIGURA 8

