

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 019**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09762071 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2303333**

54 Título: **Sacáridos Vi conjugados**

30 Prioridad:

13.06.2008 GB 0810894

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

01.06.2015

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**MICOLI, FRANCESCA;
COSTANTINO, PAOLO y
BERTI, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 537 019 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sacáridos Vi conjugados

Campo técnico

La invención se refiere a vacunas, de forma más particular aquellas contra fiebre tifoidea.

5 Técnica anterior

La fiebre tifoidea es una enfermedad seria común en muchas partes del mundo. Se usa polisacárido capsular purificado de *Salmonella Typhi* (Vi) como una vacuna, proporcionando aproximadamente 70% de protección frente a fiebre tifoidea en individuos de 5 a 45 años de edad. Sin embargo la vacuna es incapaz de establecer memoria inmunológica y no es eficaz en bebés y niños [1]. Una vacuna conjugada de Vi acoplada con exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* mutante recombinante (Vi-rEPA) dio una respuesta de refuerzo en chicos jóvenes y era muy eficaz [2].

El documento WO 02/20059 A2 describe un procedimiento para la producción de un conjugado de polisacárido capsular purificado de *salmonella typhi*, en el que se combina simultáneamente una fracción purificada de la proteína vehículo albúmina de suero de pollo con la carbodiimida EDC y el conector ADH, seguido de eliminación del conector en exceso mediante diálisis.

Lillo (2003) Carbohydrate Polymers 51(3):317-325 describe que la oxidación de poli- α -D-falactosamina con óxidos de nitrógeno da un derivado que es similar al polisacárido Vi antigénico de *Salmonella typhi*.

Es un objeto de la invención proporcionar nuevos procedimientos para la producción de vacunas de conjugado de Vi que se puedan usar a una escala industrial.

20 Descripción de la invención

Los inventores ha dilucidado un nuevo procedimiento para la producción de conjugados de Vi y por tanto han producido un nuevo conjugado que comprende Vi acoplado con CRM₁₉₇ de acuerdo con las reivindicaciones.

Un primer aspecto de la descripción proporciona un procedimiento para la preparación de un conjugado de Vi. Se añaden un conector, tal como una dihidrazida de ácido adípico (ADH), y una carbodiimida, tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) simultáneamente a una solución que contiene una proteína vehículo tal como CRM₁₉₇ o toxoide de tétanos (TT), dando una proteína vehículo derivatizada.

Se puede añadir un tampón, tal como ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) a la solución que contiene la proteína vehículo antes de la adición del ADH y EDAC. La relación en peso de la carbodiimida a la proteína es de forma típica de 0,1 a 0,15, ya que mayores relaciones de carbodiimida/proteína pueden provocar la formación de agregados.

Tras la derivatización de la proteína vehículo se elimina cualquier conector en exceso (por ejemplo, ADH), por ejemplo, mediante diálisis o filtración de flujo tangencial (TFF).

Vi es activado también con una carbodiimida y se combina subsiguientemente con la proteína vehículo derivatizada. Para la activación de Vi se pueden usar diversas relaciones de Vi a carbodiimida. Se puede usar una relación molar 1:1 (grupos COOH de Vi a carbodiimida), pero no se reduce la cantidad de derivados de carbodiimida no conjugada residual (por ejemplo, ureas tales como EDU; se pueden usar mayores ratios de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)urea, un producto de reacción soluble de acoplamiento de EDAC) es decir con un exceso molar de Vi por ejemplo > 1,5:1 y de forma ideal \geq 3:1, tales como 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o superiores. Se podría usar relaciones hasta de 200:1. Estas relaciones son mayores que las usadas en la referencia 3. La activación de Vi se puede llevar a cabo a temperatura ambiente por ejemplo en aproximadamente 2 minutos.

Por tanto el procedimiento comprende las etapas de:

- a) Combinación simultánea de un conector, una carbodiimida y una proteína vehículo.
- b) Hacer reaccionar Vi con una carbodiimida
- c) Hacer reaccionar el producto de la etapa a) con el producto de la etapa b).

Las etapas a) y b) se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

Tras la etapa a), pero antes de la etapa c), se puede eliminar cualquier conector en exceso.

Este aspecto de la descripción también proporciona un procedimiento para la preparación de un conjugado de Vi-CRM₁₉₇, en el que Vi se combina con CRM₁₉₇ derivatizado. El procedimiento comprende las etapas de:

- a) Hacer reaccionar Vi con una carbodiimida
- b) Hacer reaccionar el producto de la etapa a) con CRM₁₉₇ derivatizado.

Este aspecto de la descripción proporciona también un procedimiento para la preparación de un conjugado de Vi-CRM197, que comprende la etapa de:

- 5 a) Hacer reaccionar Vi activado con CRM₁₉₇ derivatizado

La referencia 3 describe un procedimiento para la preparación de conjugados de Vi con rEPA y albúmina de suero bovino (BSA) mediante síntesis mediada con carbodiimida con ADH como el conector. Sin embargo, este procedimiento no implica la combinación simultánea de rEPA/BSA, ADH y EDAC. Más bien rEPA/BSA y ADH se combinan y mezclan antes de la adición de ENAC.

- 10 Un segundo aspecto de la invención proporciona un conjugado de Vi-CRM₁₉₇. Este conjugado se puede preparar mediante el procedimiento anterior, o se puede obtener por otros medios.

Sacárido Vi

- 15 Vi es el sacárido capsular de *Salmonella typhi* (clasificado previamente como una especie en sí, pero ahora denominado como la *typhi* serovar de *S. enterica*). Vi puede también encontrarse en otros serovares de *Salmonella* (tal como serovar *paratyphi C* de *S. entérica* o serovar *dublin*) y en otras bacterias, tales como *Citrobacter* (por ejemplo *C. freundii* y *C. youngae*). El polisacárido Vi es un homopolímero lineal de un ácido hexosaminurónico, ácido α 1,4-N-acetilgalactosaminourónico, que está acetilado al 60 - 90% en la posición C-3 [4-9]. La sustitución de O-acetilo en Vi es un factor en su capacidad para dar una respuesta inmunoprotectora [10]. La inmunogenicidad de Vi está estrechamente relacionada con su grado de O-acetilación. La des-O-acetilación parcial puede aumentar ligeramente la inmunogenicidad; la des-O-acetilación completa elimina la inmunogenicidad de Vi [11].

- 20 El sacárido Vi usado en la presente invención se puede modificar químicamente respecto al sacárido capsular que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el sacárido Vi puede estar parcialmente des-O-acetilado, des-N-acetilado (parcial o completamente), N-propionato (parcial o completamente), etc. La des-acetilación puede tener lugar antes, durante o tras conjugación, pero preferiblemente tiene lugar antes de la conjugación. El efecto de des-acetilación etc. se puede evaluar por ensayo rutinario.

- 25 El sacárido Vi se puede hidrolizar para formar polisacáridos acortados (por ejemplo, con un grado de polimerización (DP) de al menos 10, por ejemplo, 20, 30, 40, 50, 60 ó más) u oligosacáridos (por ejemplo, con un grado de polimerización de 2 a 10). Se prefieren oligosacáridos a polisacáridos para uso en vacunas. El grado medio de polimerización se puede medir de forma conveniente mediante cromatografía de intercambio de iones o por ensayo colorimétrico [12].

- 30 Además se ha encontrado por inmunodifusión doble que pectina, cuando está O-acetilada en C-2 y C-3, es antigénicamente idéntica a Vi. La estructura de Vi difiere de la de la pectina en que está N-acetilada en C-2 y O-acetilada en C-3. La pectina O-acetilada conjugada con toxoide de tétanos da anticuerpos de Vi en ratones, y la reinyección da una respuesta de refuerzo [13,14]. De acuerdo con lo anterior la pectina O-acetilada se puede usar en la invención en lugar de Vi. Sin embargo los conjugados Vi se han evidenciado que son significativamente más inmunogénicos que sus análogos de pectina O-acetilada, y de este modo Vi se prefiere de fuentes naturales [13]. No obstante, se entenderá que referencias a "Vi" puede incluir "pectina O-acetilada" y cualesquiera otras moléculas que pueden ser estructuralmente o antigénicamente idénticas a Vi y son capaces de dar anticuerpos que reconocen Vi nativo.

- 35 "Vi" puede referirse a un polisacárido Vi (por ejemplo, con un grado de polimerización de al menos 10, por ejemplo 20, 30, 40, 50, 60 o más) o un oligosacárido Vi (por ejemplo, con un grado de polimerización de 2 a 10) y puede haber sido modificado químicamente. Los oligosacáridos pueden ser el resultado de la despolimerización y/o hidrólisis de un polisacárido padre.

Purificación de Vi

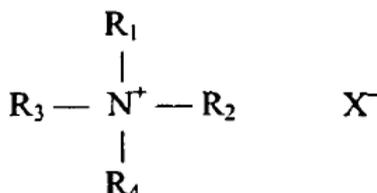
- 45 Se pueden purificar sacáridos capsulares mediante técnicas conocidas, como se describe en las referencias de esta invención. Un procedimiento típico implica la extracción con base, centrifugación, filtración, tratamiento con ARNasa/ADNasa, tratamiento con proteasa, concentración, cromatografía de exclusión molecular, ultrafiltración, cromatografía de intercambio de aniones y además ultrafiltración.

Se describe un procedimiento particularmente útil en la referencia 15.

- 50 Un procedimiento para la purificación de Vi puede comprender las etapas de (a) precipitación de Vi, seguido de (b) solubilización del Vi precipitado usando un alcohol tal como etanol.

Precipitación y solubilización con alcohol

Se conocen en la técnica muchas técnicas para la precipitación de polisacáridos solubles, tales como Vi. Procedimientos preferidos usan uno o más detergentes catiónicos. Los detergentes preferiblemente presentan la siguiente fórmula general:



5

en la que: R_1 , R_2 y R_3 son los mismos o diferentes y significa cada uno de ellos alquilo o arilo; o R_1 y R_2 junto con el átomo de nitrógeno al que estos están unidos forman un anillo heterocíclico saturado de 5 ó 6 miembros, y R_3 significa alquilo o arilo; o R_1 , R_2 y R_3 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros, insaturado en el átomo de nitrógeno,

10

R_4 significa alquilo o arilo, y

X^- significa un anión.

15

Detergentes particularmente preferidos para uso en el procedimiento son sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro). El bromuro de cetiltrimetilamonio ("CTAB") es particularmente preferido [16]. CTAB es también conocido como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de cetrimonio, cetavlon y centimida. Otros detergentes incluyen bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio.

Vi puede ser liberado en medios durante el cultivo. De acuerdo con esto el material de partida para la precipitación será de forma típica el sobrenadante de un cultivo bacteriano centrifugado o será un cultivo concentrado. Este material puede filtrarse para eliminar la turbidez.

20

La etapa de precipitación puede ser selectiva para Vi, pero de forma típica co-precipitarán otros componentes (por ejemplo, proteínas, ácido nucleico, etc.).

Vi precipitado se puede recoger por centrifugación antes de la solubilización.

25

Tras precipitación, Vi (de forma típica en la forma de un complejo con el detergente catiónico) es redisuelto. Se prefiere usar un disolvente que es relativamente selectivo para Vi con el fin de minimizar contaminantes (por ejemplo, proteínas, ácido nucleico, etc.). Se ha encontrado que el etanol es ventajoso a este aspecto, y es muy selectivo para el complejo CTAP-Vi. Se pueden usar otros alcoholes inferiores (por ejemplo, metanol, propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc.).

El alcohol se añade preferiblemente al Vi precipitado para dar una concentración de alcohol final (en base al contenido total del alcohol y agua) entre 50% y 99% (por ejemplo en torno a 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o en torno a 90%), y preferiblemente entre 75% y 95%.

30

El alcohol se puede añadir al Vi precipitado en forma pura o se puede añadir en una forma diluida con un disolvente miscible (por ejemplo, agua). Mezclas de disolvente preferidas son mezclas de alcohol:agua con una relación preferida entre aproximadamente 70:30 y aproximadamente 95:5 (por ejemplo 75:25, 80:20, 85:15, 90: 10).

Comparado con procedimientos convencionales para la preparación de polisacáridos capsulares, el procedimiento en dos etapas de precipitación seguido de extracción con alcohol es más rápido y más sencillo.

35

Por el contrario al procedimiento descrito en la referencia 17, el procedimiento usa detergente catiónico más que detergente aniónico. A diferencia que el procedimiento de la ref. 18, la precipitación no requiere un soporte poroso inerte. Adicionalmente, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, se usa un alcohol para redisolver Vi más que para precipitarlo.

Procesamiento adicional del polisacárido disuelto

40

Tras resolubilización, se trata adicionalmente Vi para eliminar contaminantes ya que, en la producción de vacuna humana, no es aceptable la más mínima contaminación.

Este tratamiento puede incluir centrifugación del complejo CTAP-Vi solubilizado, seguido de precipitación de Vi del sobrenadante obtenido mediante intercambio de cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio) dando un precipitado de Vi que es insoluble en el alcohol pero soluble en agua.

Este precipitado se puede recoger por centrifugación y lavarse adicionalmente en alcohol y redisolverse en una solución acuosa si se desea.

El procedimiento de tratamiento implicará de forma típica una o más etapas de filtración.

Se puede usar filtración en profundidad. Esto es particularmente útil para clarificación.

- 5 Se puede usar filtración a través de carbono activado. Esto es útil para la eliminación de pigmentos y compuestos orgánicos traza. Se puede repetir hasta, por ejemplo, $OD_{275nm} < 0,2$.

Se puede usar filtración o ultrafiltración por tamaño.

- 10 Si se hidroliza Vi el hidrolizado por lo general será tamizado con el fin de eliminar oligosacáridos de longitud corta. Esto se puede conseguir en diversas etapas tales como ultrafiltración seguido de cromatografía de intercambio de iones.

No obstante la invención no se ve limitada a sacáridos purificados de fuentes naturales, y los sacáridos se pueden obtener por otros procedimientos tales como síntesis total o parcial.

Conjugados

- 15 Vi puro es un inmunógeno pobre. Para eficacia protectora, por tanto, Vi puede presentarse al sistema inmune como un conjugado de Vi-vehículo. El uso de conjugación con proteínas vehículo con el fin de mejorar la inmunogenicidad de antígenos de carbohidrato es bien conocido [por ejemplo, revisado en referencias 19 a 27, etc.] y se usa en particular para vacunas pediátricas [28]. Como se describió anteriormente se puede conjugar un sacárido con una proteína vehículo o con una mezcla de diferentes proteínas vehículo. De forma similar, una proteína vehículo puede portar un sacárido o una mezcla de diferentes sacáridos, es decir, múltiples sacáridos diferentes [29].

- 20 La invención proporciona un conjugado de (i) Vi, y (ii) CRM₁₉₇ como una proteína vehículo.

El CRM₁₉₇ se puede conjugar covalentemente con Vi directamente o mediante un conector.

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada con cualquiera conector adecuado según sea necesario. Los oligosacáridos se tamizarán de forma típica antes de la conjugación. Cuando la composición de la invención incluya un sacárido despolimerizado se prefiere que la despolimerización preceda a la conjugación.

- 25 La unión de Vi a CRM₁₉₇ es preferiblemente mediante un grupo -NH₂ por ejemplo en la cadena lateral de un residuo de lisina en CRM₁₉₇, o de un residuo de arginina. La unión al CRM₁₉₇ puede ser también mediante un grupo -SH por ejemplo en la cadena lateral de un residuo de cisteína. De forma alternativa, Vi puede estar unido a CRM₁₉₇ mediante una molécula conectora como se describió anteriormente.

- 30 Vi se activará de forma típica o será funcionalizado antes de la conjugación. Una técnica preferida usa carbodiimidias (por ejemplo, 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC)). Otras técnicas adecuadas usan hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDAC, TSTU (véase también la introducción de la referencia 30).

- 35 Se pueden usar uniones mediante un grupo conector a proteínas vehículo en general usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 31 y 32. Un tipo útil de unión es un conector de ácido adípico, que pueden estar formados por acoplamiento de un grupo -NH₂ libre (por ejemplo, introducido en Vi mediante aminación) con ácido adípico (usando, por ejemplo activación con diimida), y luego acoplamiento de una proteína al intermedio de sacárido-ácido adípico resultante [23, 33, 34]. Otro tipo útil de unión es un conector de carbonilo, que puede estar formado por reacción de un grupo hidroxilo libre de un Vi modificado con CDI [35, 36] seguido de reacción con una proteína para formar un unión de carbamato. Un conector útil es dihidrazida de ácido adípico ADH [37]. La proteína vehículo puede ser derivatizada con ADH (por ejemplo, por acoplamiento con carbodiimida en un grupo lateral ácido carboxílico) y unirse subsiguientemente a Vi [3] (de nuevo, por ejemplo, por acoplamiento con carbodiimida). Otros conectores incluyen β-propionamido [38], nitrofenil-etilamina [39], haluros de haloacilo [40], conectores glicosídicos [41], ácido 6-aminocaproico [42], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [43], restos C₄ a C₁₂ [44], etc. Se puede usar también condensación con carbodiimida [45].

- 40 Un procedimiento útil para la unión de Vi a CRM₁₉₇ implican la tiolación de Vi con cistamina o cisteamina (acoplamiento de carbodiimida) y reacción subsiguiente con CRM₁₉₇ derivatizado con SPDP [46].

Otro procedimiento útil implica la introducción de grupos amino en Vi seguido de derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, diéster N-hidroxisuccinimido de ácido adípico) y reacción con CRM₁₉₇.

- 50 Se puede usar un conector bifuncional para proporcionar un primer grupo para acoplamiento con un grupo amino que se ha introducido en Vi y un segundo grupo para acoplamiento al vehículo (de forma típica para acoplamiento a una amina en el vehículo).

El primer grupo en el conector bifuncional es por tanto capaz de reaccionar con un grupo amino (-NH₂) en Vi. Esta reacción implicará de forma típica una sustitución electrófila del hidrógeno de la amina. El segundo grupo en el conector bifuncional es capaz de reaccionar con un grupo amina en el vehículo. Esta reacción implicará de forma típica de nuevo una sustitución electrófila de la amina.

- 5 Cuando las reacciones tanto con Vi y la proteína vehículo impliquen aminas entonces se prefiere el uso de un conector bifuncional, por ejemplo, un conector homobifuncional de fórmula X-L-X, donde: los dos grupos X son los mismos que cada uno de los otros y pueden reaccionar con las aminas; y donde L es un resto de unión en el conector. Un grupo X útil es N-oxisuccinimida. L puede presentar la fórmula L'-L²-L', donde L' es carbonilo. Grupos L² útiles son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀) por ejemplo -(CH₂)₄-.

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

Conectores bifuncionales adicionales para uso con la invención incluyen haluros de acrililo (por ejemplo, cloruro) y haluro de haloacilo.

- 15 El conector se añadirá por lo general en exceso molar a Vi modificado.

Proteínas vehículo preferidas son toxinas bacterianas, tales como difteria o toxinas de tétanos, o toxoides o mutantes de los mismos. Estos se usan habitualmente en vacunas de conjugado. El mutante de la toxina de difteria CRM₁₉₇ es particularmente preferido [47].

- 20 Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen el complejo de proteína de membrana exterior de *N. meningitidis* [48], péptidos sintéticos [49,50], proteína de choque térmico [51,52], proteínas *pertussis* [53,54], citoquinas [55], limfoquinas [55], hormonas [55], factores de crecimiento [55], proteínas artificiales que comprende epítopos de célula T CD4⁺ human múltiple de diversos antígenos derivados de patógenos [56] tales como N19 [57], proteína D de *H. influenzae* [58-60], pneumolisina [61] o sus derivados no tóxicos [62], proteína PspA de superficie pneumococcal [63], proteína de ingesta de hierro [64], toxina A o B de *C. difficile* [65], exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (rEPA) [66], etc. Es posible usar mezclas de proteínas vehículo. Una proteína vehículo puede portar múltiples sacáridos Vi [67].

- 25 Los conjugados pueden presentar proteína vehículo en exceso (p/p) o Vi en exceso (p/p), por ejemplo, en el intervalo de relación de 1:5 a 5:1. Los conjugados con proteína vehículo en exceso son típicos, por ejemplo, en el intervalo de 0,2: 1 a 0,9: 1, tales como 0,5: 1, o con pesos iguales (1:1). En algunas realizaciones la relación de Vi:proteína se encuentra entre 0,4:1 y 1.2:1.

30 Cuando el conjugado forma el componente Vi en una composición inmunogénica de la invención la composición puede comprender también proteína portadora libre [68].

El resto Vi en el conjugado es preferiblemente un polisacárido Vi o un oligosacárido de bajo peso molecular, como se definió anteriormente. Los oligosacáridos se tamizarán de forma típica antes de la conjugación.

- 35 El conjugado proteína-Vi es preferiblemente soluble en agua y/o en un tampón fisiológico.

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) conjugado de Vi, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una discusión al respecto de tales vehículos se encuentra disponible en la ref. 69.

- 40 Las infecciones microbianas afectan a diversas zonas del cuerpo y de este modo las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La composición se puede preparar para administración por vía tópica, por ejemplo, como un ungüento, crema o polvo. La composición se puede preparar para administración por vía oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para administración por vía pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición se puede preparar como un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración por vía nasal, aural u ocular, por ejemplo, como gotas, como un aerosol, o como un polvo [p.e. 70]. La composición puede estar incluida en un enjuague bucal. La composición puede ser liofilizada.

- 50 La composición farmacéutica es preferiblemente estéril. Está preferiblemente libre de pirógenos. Está preferiblemente tamponada por ejemplo entre pH 6 y pH 8, en general en torno a pH 7.

Una composición de la invención puede comprender un conjugado de Vi y solución salina.

La invención también proporciona un dispositivo de liberación que contiene una composición farmacéutica de la invención. El dispositivo puede ser, por ejemplo, una jeringuilla o un inhalador.

Composiciones farmacéuticas de la invención son preferiblemente composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunogénicamente efectiva de inmunógeno Vi. Por "cantidad inmunogénicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien una dosis única o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía en función de la salud y estado físico del individuo que se va a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a ser tratado (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo frente a anticuerpos de síntesis, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica del doctor encargado del tratamiento y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos rutinarios. Se espera una dosis entre 1 µg y 20 µg de sacárido, por ejemplo, aproximadamente de 5 µg/dosis. El tratamiento de dosificación puede ser un calendario de dosis única o un calendario de dosis múltiple (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo). La composición se puede administrar junto con otros agentes inmunoregulatorios.

Una vez formuladas las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales; en particular se pueden tratar sujetos humanos.

Se pueden usar composiciones inmunogénicas terapéuticamente (es decir, tratar una infección existente) o profilácticamente (es decir, evitar la futura infección).

Una composición inmunogénica puede no estar adyuvada. En otras realizaciones, sin embargo, una composición inmunogénica puede incluir un adyuvante, que puede funcionar para mejorar las respuestas inmunes (humoral y/o celular) dadas en un paciente que recibe la composición. Adyuvantes que se pueden usar con la invención incluyen:

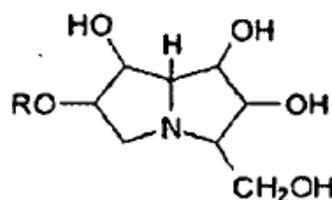
- Una composición que contiene mineral, incluyendo sales de calcio y de aluminio (o mezclas de las mismas). Sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" descritas en la referencia 71). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc. con las sales adquiriendo cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contiene mineral pueden por tanto formularse como una partícula de sal de metal [72]. Se pueden usar adyuvantes conocidos como hidróxido aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan solo por conveniencia, ya que no es una descripción precisa del compuesto químico actual que está presente (véase, por ejemplo, el capítulo 9 de la referencia 155). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes "hidróxido" o "fosfato" que son de uso general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son de forma típica sales de oxihidróxido de aluminio, que son usualmente al menos parcialmente cristalinos. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son de forma típica hidroxifosfatos de aluminio, frecuentemente también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Estos se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato para hidroxilo en la sal. La invención puede usar una mezcla de ambos, un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1 por ejemplo $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc. La concentración de Al^{+++} en una composición para administración a un paciente es preferiblemente menor de 10 mg/ml, por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido está entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg/dosis.
- Saponinas [capítulo 22 de ref. 155], que son un grupo heterólogo de esterolglucósidos y triterpenoide glucósidos que se encuentran en el corteza, hojas, tallo, raíces e incluso flores de una amplio intervalo de especies de planta. La saponina de la corteza del árbol Molina *Quilliaia saponaria* ha sido ampliamente estudiada como adyuvante. La saponina se puede obtener también comercialmente de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (brides veil), y *Saponaria officinalis* (raíz de la sopa). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como también formulaciones de lípido, tales como ISCOMs. QS21 se comercializa como Stimulon™. Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas que usan estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS 18, QS21, QH-A, QH- B y QH-C. Preferiblemente la saponina es QS21. Se describe un procedimiento de producción de QS21 en ref. 73. Las formulaciones de saponina pueden comprender también un esteroles, tales como colesterol [74]. Se pueden usar combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de ref. 155]. ISCOM incluye también de forma típica un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Se puede usar cualquier saponina conocida en ISCOM. Preferiblemente el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA & QHC. ISCOM se describen adicionalmente en referencias 74-76. De forma opcional los ISCOM puede estar exentos de detergente adicional [77]. Se puede encontrar una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en referencias 78 y 79.
- Toxinas ADP-ribosilantes bacterianas (por ejemplo, la enterotoxina "LT" lábil por calor de *E. Coli*, toxina de cólera "CT", o toxina de pertussis "PT") y derivados detoxificados de las mismas, tales como las toxinas

mutantes conocidas como LT-K.63 y LT-R72 [80]. El uso de toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como adyuvantes mucosales se describe en la referencia 81 y como adyuvantes parenterales en la referencia 82.

- Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificadas [83] o quitosán y sus derivados [84].
- 5 • Micropartículas (es decir una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferiblemente de ~ 200 nm a ~30 µm de diámetro, o de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas por materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un polioctoéster, un polianhídrido, un policaprolactona, etc.), siendo preferida poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para presentar una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB)
- 10 • Liposomas (capítulos 13 y 14 de la referencia 155). Ejemplos de formulaciones de liposoma adecuados para uso como adyuvantes se describen en las referencias 85-87.
- Péptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("tr-MDP"), N-acetilnormuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalnitoxipropilamida ("DTP-DPP", o "Teramide™), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil- sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina ("MTP-PE").
- 15 • Un polímero de polioxidonio [88,89] y otro derivado de polietilen-piperazina N-oxidado.
- Un ligando de CDId, tal como una α-glicosilceramida [90-97] (por ejemplo, α-galactosilceramida), α-glicosilceramidas que contiene fitosfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanetriol], CRONY- 101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida, etc.
- 20 • Una inulina gamma [98] o derivado de la misma, tal como algamulina.
- Una emulsión aceite-en-agua. Se conocen diversas emulsiones de este tipo y se incluyen de forma típica al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite(s) y tensioactivo(s) biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las gotas de aceite en la emulsión son por lo general menores de 5 µm de diámetro, y puede incluso presentar un diámetro submicrónico, alcanzando estos tamaños de partícula con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotas con un tamaño menor de 220 nm ya que pueden ser sometidas a esterilización con filtro.
- 25 • Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia de dinucleótido que contiene un residuo de citosina no metilado unida por un enlace de fosfato a un residuo de guanosina), o un motivo de Cpl (una secuencia de dinucleótido que contiene citosina unida a inosina), o un ARN de doble hebra, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli(dG). Oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble hebra o (excepto para ARN) de hebra simple. Las referencias 99, 100 y 101 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, reemplazo de guanosina con 2'-deoxi-7-deazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se describe además en las referencias 102-107. Se puede referir una secuencia CpG a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [108]. La secuencia puede ser específica para inducir una respuesta inmune a Th1, tal como un CpG-A ODN (oligodeoxinucleótido), o puede ser más específico para inducir una respuesta a célula B, tal como un CpG-B ODN. CpG-A y CpG-B ODN se describen en las referencias 109-111. Preferiblemente el CpG es un CpG-A ODN. Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. De forma opcional se pueden unir dos secuencias de oligonucleótido CpG en sus extremos 3' para formar "immunómeros". Véase, por ejemplo, las referencias 108 & 112-114. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otro es CpGI 826. Como una alternativa o además de usar secuencias de CpG, se pueden usar secuencias TpG [115], y estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados. El oligonucleótido inmunoestimulador pueden ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se describe en la referencia 115), y/o puede presentar una composición de nucleótido con > 25% de timidina (por ejemplo >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se describe en la referencia 115), y/o puede presentar una composición de nucleótido con >25 % de citosina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG no metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán de forma típica al menos 20 nucleótidos. Estos pueden comprender menos de 100 nucleótidos. Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimuladores es conocido como IC31™ [116]. Por tanto un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) incluyendo al menos uno (y preferiblemente múltiple) motivos Cpl, y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) incluyendo al menos uno (y preferiblemente múltiples) secuencia(s)
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

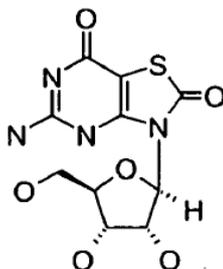
tripéptidos Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un deoxinucleótido que comprende secuencia 26-mer 5'-(IC)₁₃-3'. El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende aminoácido de 11-mer Lys-Leu-Lys-Leu₅-Lys-Leu-Lys.

- 5 • Monofosforilo lípido A 3-O-desacilado ("3dMPL", también conocido como "MPL™") [117-120]. En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo, con un diámetro < 150 nm o > 500 nm. Alguno o ambos de estos se pueden usar con la invención y se puede seleccionar las mejoras partículas por ensayo rutinario. Se prefieren partículas más pequeñas (por ejemplo, suficientemente pequeñas para dar una suspensión acuosa transparente de 3dMPL) para uso de acuerdo con la invención debido a su actividad superior [121]. Partículas preferidas presentan un diámetro medio menor de 220 nm, más preferiblemente inferiores a 200 nm o inferiores a 150 nm o inferiores a 120 nm, y puede incluso presentar un diámetro medio inferior a 100 nm. En muchos casos, sin embargo, el diámetro medio no será menor de 50 nm.
- 10 • Metilinosina 5'-monofosfato ("MIMP") [122].
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilato [123], tal que presenta una fórmula:



15 donde R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, acilo lineal o ramificado, no sustituido o sustituido, saturado o no saturado, grupos alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado del mismo. Ejemplos incluyen, pero sin limitarse a estos: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranosina, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diep-casuarina, etc.

- 20 • Un compuesto de imidazoquinolina, tal como Imiquimod ("R-837") [124,125], Resiquimod ("R-848") [126], y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, sales de clorhidrato). Detalles adicionales sobre imidazoquinolinas inmunoestimuladoras se pueden encontrar en las referencias 127 a 131.
- 25 • Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los descritos en la referencia 132. Los procedimientos de formulación, preparación y tamizado para compuestos activos se describen también en la referencia 132. Las tiosemicarbazonas son particularmente efectivas en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquina, tales como TNF- α .
- 30 • Un compuesto de triptantrina, tal como los descritos en la referencia 133. Se describen también procedimientos de formulación, preparación y tamizado de compuestos activos en la referencia 133. Las tiosemicarbazonas son particularmente efectivas en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .
- Un análogo de nucleósido tal como: (a) isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



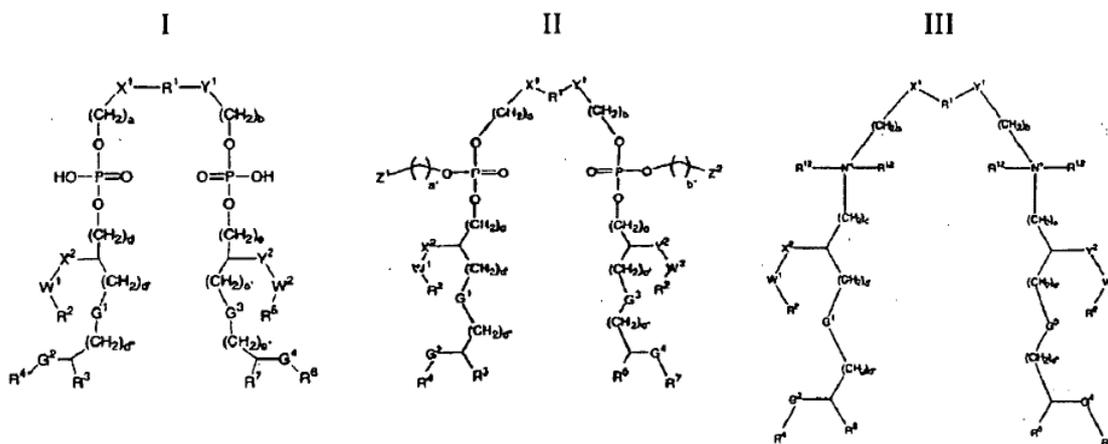
35 y profármacos del mismo; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos descritos en las referencias 134 a 136 Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [137].

- Compuestos descritos en la referencia 138, incluyendo: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoleidona, compuestos tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminiobencimidazol quinolinona (ABIQ) [139,140], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esteroles, compuestos

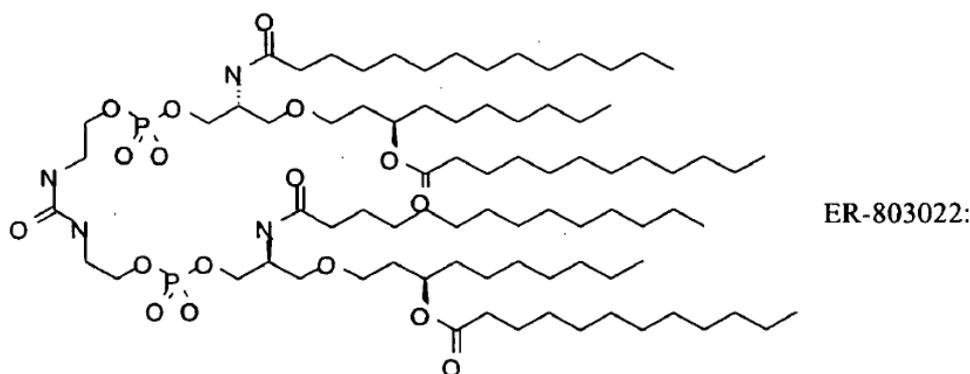
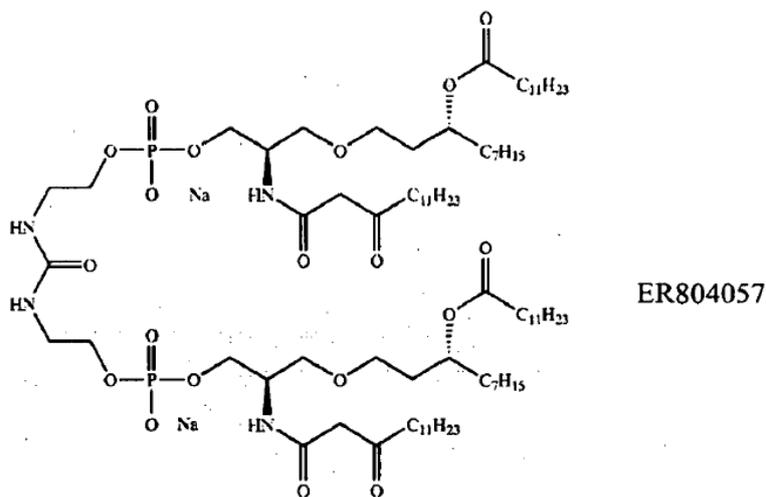
de quinazolinona, compuestos de pirrol [141], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina, y compuestos de benzazol [142].

5

- Un derivado de glucosaminidafosfato de aminoalquilo, tal como RC-529 [143,144].
- Un fosfaceno, tal como poli[di(carboxilatofeno)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 145 y 146.
- Un compuesto de fórmula I, II ó III, o una sal del mismo:



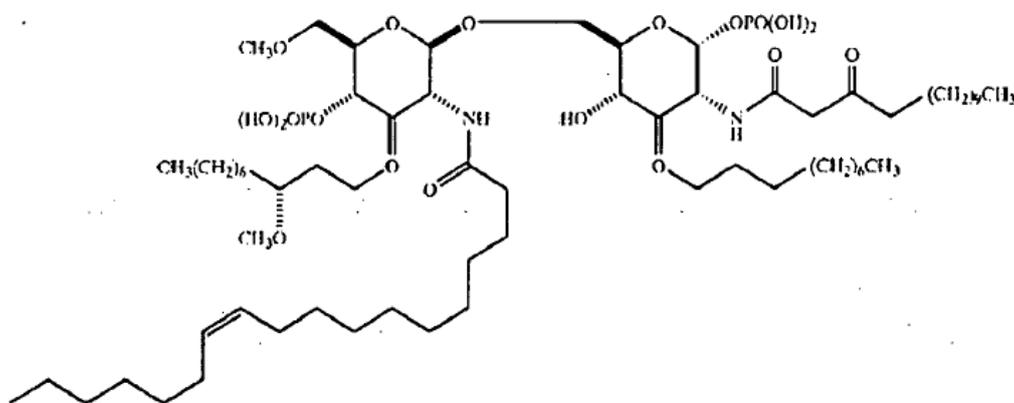
como se define en la referencia 147, tales como "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", ER 803022 o "ER 804057" por ejemplo:



10

- Derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174 (descrito en las referencias 148 & 149).

- Compuestos que contienen lípidos unidos a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, tal como el antagonista de TLR4 E5564 [150,151]:



Estos y otras sustancias activas como adyuvante se describen con mayor detalle en las referencias 155 & 156.

- 5 Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán de forma en mezcla.

Las composiciones pueden incluir dos o más de dichos adyuvantes. Por ejemplo, estos pueden incluir de forma ventajosa tanto una emulsión aceite-en-agua como 3dMPL, etc.

Adyuvantes de emulsión aceite-en-agua específicos útiles con la invención incluyen:

- 10
- Una emulsión submicrónica de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente 5% de escualeno, aproximación 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de San 85. En términos de peso, estas relaciones llegan a ser de 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de Span 85. Este adyuvante es conocido como "MF59" [152-154], como se describe con mayor detalles en el capítulo 10 de referencia 155 y capítulo 12 de la referencia 156. La emulsión de MF59 de forma ventajosa incluye iones de citrato, por ejemplo, tampón de citrato sódico 10 mM.
- 15
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. Esta puede incluir Span 85 (por ejemplo a 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden presentar de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de Tween 80, y la relación en peso de escualeno:tocopherol es preferiblemente ≤ 1 ya que esta proporciona una emulsión más estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5:2. Se puede hacer
- 20
- una emulsión de este tipo resolviendo Tween 80 en PBS dando una solución del 2%, mezclando luego 90 ml de esta solución con una mezcla de 5 g de DL- α -tocopherol y 5 ml de escualeno), luego microfluidización de la mezcla. La emulsión resultante puede presentar gotas de aceite submicrónicas, por ejemplo, con un diámetro medio entre 100 y 250nm, preferiblemente aproximadamente 180 nm.
- 25
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión puede incluir también un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.
- 30
- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocopherol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocopherol), y estas concentraciones incluirían cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión puede incluir también escualeno. La emulsión puede incluir también un 3d-MPL (véase a continuación). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- 35
- Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ LI 21"). La emulsión puede estar formulada en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de liberación útil para dipéptidos de muramilo, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [157] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de escualeno, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se puede usar también sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [158] (5% de escualeno, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.
- 40
- Una emulsión que presenta de 0,5-50% de un aceite, 0,1-10% de un fosfolípico, y de 0,05-5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 159, son componentes de fosfolípido preferidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfático, esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos tamaños de gota submicrónicos.

- Una emulsión aceite-en-agua submicrónica de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos tal como saponina QuiLA, colesterol, un conjugado lipófilo de saponina (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 160, producido por adición de amina alifático a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxiethyl)propanediamina.
- Una emulsión en la que se asocian una saponina (por ejemplo, QuiLA o QS21) y un estereol (por ejemplo, un colesterol) como micelas helicoidales [161].

Tratamientos médicos y usos

La invención también proporciona un conjugado de Vi de la invención, para uso en medicina, por ejemplo, para uso en el aumento de una respuesta inmune en un mamífero.

La invención también proporciona un procedimiento para el aumento de una respuesta inmune en un mamífero, que comprende la administración de un conjugado de Vi o composición farmacéutica de la invención al mamífero.

La invención también proporciona el uso de un conjugado de Vi de la invención en la producción de un medicamento para la prevención o tratamiento de la fiebre tifoidea en un mamífero.

La respuesta inmune aumentada con estos procedimientos y usos incluirá por lo general una respuesta de anticuerpo, preferiblemente una respuesta de anticuerpo protectora. Los procedimientos para la evaluación de las respuestas de anticuerpo tras inmunización con sacárido son bien conocidos en la técnica. La respuesta de anticuerpo es preferiblemente una respuesta de IgA o IgG. La respuesta inmune puede ser profiláctica y/o terapéutica. El mamífero es preferiblemente un ser humano.

Las composiciones de la invención se administrarán por lo general directamente a un paciente. La liberación directa se puede conseguir mediante inyección por vía parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, o al espacio intersticial de un tejido), o por administración por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intradérmica, ocular, nasal, aural, o pulmonar. Se prefiere la inyección o administración por vía intranasal.

La invención se puede usar para dar inmunidad sistémica y/o mucosal.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar tanto niños (incluyendo bebés) como adultos. Por tanto un sujeto puede ser menor de 1 año, de 1 a 5 años, de 5 a 15 años, de 15 a 55 años, o al menos 55 años de edad. Sujetos preferidos para recibir las vacunas son los jóvenes (por ejemplo, < 5 años). Las vacunas no son adecuadas solamente para estos grupos no obstante, y se pueden usar más generalmente en una población.

El tratamiento puede ser mediante un calendario de dosis única o un calendario de dosis múltiple. Se pueden usar dosis múltiple en un calendario de inmunización primario y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. En un calendario de dosis múltiple las diversas dosis se pueden administrar con la misma o diferente rutas, por ejemplo, un cebado parenteral y refuerzo mucosal, un cebado mucosal y refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (de forma típica dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente inactivos. Se administrarán de forma típica dosis múltiples al menos 1 semana a parte (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). Un calendario ejemplo proporciona una primera dosis a las 6 semanas de edad y una segunda dosis a 10 semanas de edad, para coincidir con inmunizaciones existentes de bebés (co-administración con vacunas EPI). Este calendario primario puede ser seguido de una dosis de refuerzo tras el primer año de edad del niño.

Se pueden combinar conjugados de la invención con antígenos distintos de Vi en una composición única para inmunización simultánea contra múltiples patógenos. Como una alternativa para hacer una vacuna combinada se pueden administrar conjugados a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud o centro de vacunación) otras vacunas. Antígenos para uso en estas vacunas de combinación o para administración concomitante incluyen, por ejemplo, inmunógenos de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y/o *Pseudomonas aeruginosa*, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, *Neisseria meningitidis* (tal como sacáridos o sacáridos conjugados, para serogrupos A, C, WI 35 y/o Y), *Streptococcus pneumoniae* (tales como sacáridos o sacáridos conjugados), etc.

En una realización una composición puede comprender un conjugado de Vi de la invención en combinación con un antígeno de *Salmonella paratyphi A*, tal como un antígeno de H o O (por ejemplo, un antígeno de sacárido O:2), para proporcionar una vacuna tifoide bivalente. En otra realización una composición puede comprender un conjugado de Vi de la invención en combinación con un antígeno de *Salmonella typhimurium*, tal como un antígeno de H o O (por ejemplo, un sacárido O:9). En otra realización una composición puede comprender un conjugado de Vi de la invención en combinación con un antígeno de *Salmonella enteritidis*, tal como un antígeno de H o O (por ejemplo, un sacárido O:4,5).

Definiciones

El término “comprende” engloba “incluye” así como también “consiste en” por ejemplo una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

5 La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” por ejemplo, una composición que es “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

El término “aproximadamente” en relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

10 Cuando se usan materiales animales (y de forma particular de bovinos) en el cultivo de células estos deberían obtenerse de fuentes que se encuentren libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE), y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). En general se prefiere cultivar células en total ausencia de materiales derivados de animales.

Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición entonces ese compuesto puede reemplazarse de forma alternativa con un profármaco adecuado.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 ilustra la fórmula estructural de *S. typhi* Vi (ácido α 1,4-N-acetil galactosaminourónico).

La figura 2 muestra un esquema de reacción para la preparación de proteínas derivatizadas.

La figura 3 muestra un análisis SEC de CRM₁₉₇ y CRM₁₉₇ derivatizado con ADH.

La figura 4 muestra un análisis SEC de toxoide de tétanos derivatizado con ADH.

La figura 5 muestra modelos de SDS page de, de izquierda a derecha, TT, TT_{ADH}, CRM y CRM_{ADH}.

20 La figura 6 muestra un esquema de reacción para la preparación de un conjugado de Vi-proteína.

La figura 7 y la figura 8 muestra perfiles de filtración en gel de Vi y toxoide de tétanos en Sephacryl S-1000.

La figura 9 muestra un perfil de filtración en gel de “pool 1”, y la figura 10 muestra un perfil de “pool 2”.

La figura 11 muestra un análisis SEC de Vi-TT ADH.

La figura 12 muestra un perfil de SDS-PAGE (3-8% de gel) de mezclas de reacción de Vi-CRM_{ADH} tras diálisis.

25 La línea 2 es CRM_{ADH} (5 μ g), líneas 3 - 5 son 10 μ l de las mezclas de reacción tras diálisis de lotes 04 a 06 respectivamente.

La figura 13 muestra la purificación del lote 06 en Sephacryl S-1000.

La figura 14 muestra un perfil SDS-PAGE (3-8% de gel) de: "2" - CRM_{ADH} 3 μ g, "3" – mezcla de reacción 10 μ l y fracciones 1 - 11 y 12 - 22 de la purificación del lote 06.

30 Las figura 15 a 17 muestran análisis SEC que comparan pools 1 obtenidos de los lotes 04 a 06, pools 2 obtenidos de lotes 04 a 06, y pools 1 y 2 obtenidos el lote 06.

35 La figura 18 muestra el valor de anti-Vi anticuerpo medio. Las figuras 18A y 18B muestran datos de diferentes lotes de conjugados, pero los grupos de control son los mismos en cada caso. De izquierda a derecha los grupos en ambos 18A y 18B son: PBS; Vi; Vi+CRM197; Vi+TT; Vi-CRM197; Vi-TT; Vi-CRM197 con alumbre; Vi-TT con alumbre; y Vi-CRM 197 con CFA+IFA.

Modos de llevar a cabo la invención

Purificación de Vi

40 Se concentró el sobrenadante de una muestra de 5 l de *C. freundii* WR7001 en mod-LB (20 veces) hasta 250 ml con una membrana de 100K. Se diafiltró la muestra contra NaCl 1 M (2,5 l) y luego con agua (1,5 l), de nuevo con una membrana de 100K, y se desechó el permeado. Se usó un filtro de 0,22 μ m para eliminar la turbidez. Subsiguientemente se añadió 0,9% de CTAB para formar un precipitado de Vi-CTAB. Esto se centrifugó a 18000g durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante.

45 Se suspendió el precipitado en etanol (96%, 110 ml) y se mezcló durante la noche a RT antes de la centrifugación subsiguiente a 18000g durante 50 minutos, tras lo cual se desechó el precipitado resultante. Se añadió NaCl 0,1 M al sobrenadante para formar un gel que se centrifugó a 18000g durante 10 minutos. Se recogió el precipitado y se

lavó con etanol, luego se solubilizó en NaCl acuoso (1M, 50 ml) y se filtró. Se llevó el retenido hasta 80% de etanol y se centrifugó a 18000g durante 10 minutos. El precipitado se lavó de nuevo con etanol. Una parte del precipitado permaneció en suspensión (lote A). Se recogieron las dos partes por separado como lote A (97 mg) y lote B (170 mg).

- 5 En un procedimiento modificado se concentró el sobrenadante hasta 8,0-10,0 g/l con una membrana de 100K. Se diafiltró la muestra frente a NaCl 1 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,02M pH 7,3 (2,5 l) y luego con agua (2,5 l), de nuevo con una membrana de 100K, y se desechó el permeado. Subsiguientemente se añadió 2,0% de CTAB para formar un precipitado de Vi-CTAB. El precipitado se centrifugó a 18000g durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó luego el precipitado con agua, se centrifugó y se resuspendió en etanol (85%) y se mezcló hasta que se solubilizase por completo. Se pasó la solución a través de SP10 y filtros de carbono. Se precipitó el filtrado con NaCl 0,2 M y se centrifugó a 18000g durante 5 minutos. Se resuspendió el precipitado en NaCl 1,0 M dando una concentración de 3-5 mg/ml. Esta solución se diafiltró frente a agua y se filtró a 0,22 μ M.

15 El procedimiento de purificación presenta un buen rendimiento y proporciona sacárido con buena pureza (menos de 0,5% de proteína, menos de 0,01% de ácido nucleico) y es muy susceptible de conservar altos niveles de O-acetilación.

Derivatización de toxoide de tétanos

Se añadieron ADH (3,25 por mg de proteína) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (EDAC/proteína = 0,152 p/p) a toxoide de tétanos (en tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 50-100 mM, pH 6,18 a 6,20). La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente.

- 20 Se dializó la mezcla de reacción frente a NaCl 0,2 M, tampón MES 5 mM, pH 7,05, 2-8° C y tampón MES 5 mM, pH 7,00, 2-8° C. Se obtuvo toxoide de tétanos derivatizado (rendimiento del 86%).

Derivatización de CRM₁₉₇

Se añadieron ADH (3,5 mg por mg de proteína) y EDAC (EDAC/proteína = 0,15 p/p) a CRM 197 (11,5 mg/ml en tampón MES 50-100 mM, pH 6,0). Se llevó a cabo la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente, pH 6,0-6,2. El mantenimiento del pH en este intervalo evitó la precipitación de la proteína.

- 25 Se dializó durante la noche la mezcla de reacción frente a tampón MES 5 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,0 y luego frente a tampón MES 5 mM, pH 7,0 a 4° C. Se midió la proteína mediante análisis microBCA (rendimiento de 75-85%). Se añadió sacarosa al 10% p/v al producto y se conservó a -20° C. Más que conservar con sacarosa se puede conservar en MES 5 mM, pH 7,0.

Caracterización de proteína derivatizada

Se verificó la derivatización de las proteínas con ADH mediante un procedimiento colorimétrico (procedimiento TNBS).

La relación molar de ADH a TT se midió mediante MS Maldi-Tof en aproximadamente 11.

- 35 Se midió la relación molar de ADH a CRM₁₉₇ mediante MS Q-Tof. Esto mostró la formación de diversos productos caracterizados por la presencia de un número diferente de conectores unidos a la proteína (de 3 a 10, el producto principal contiene 6 conectores unidos).

40 Las proteínas derivatizadas (y subsiguientemente, los conjugados) se examinaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (Sds-PAGE) usando 3-8% de geles de tris-acetato (NuPAGE). Se añadieron a las muestras (5-20 μ l para que tengan un contenido en proteína de 5 μ g) DTT 0,5 M (1/5 v/v) y tampón NuPAGE LDS (1/5 v/v). Se calentaron las muestras a 100° C durante 1 minuto y se aplicaron las muestras a los pocillos. El gel se sometió a electroforesis a 30 m en tampón Tris-acetato SDS SDS Running (Invitrogen). Al final se tintó con tinte Simply Blue Safe (Invitrogen).

45 Se encontró que los modelos de SDS-PAGE y perfiles de SEC (214 nm, gel TSK 4000; tampón fosfato 100 mM + NaCl 100 mM + 5% de CH₃CN, pH 7,0) de las proteínas derivatizadas eran similares a los de las proteínas nativas (véase la figura 3 a la figura 5).

Conjugación de Vi con toxoide de tétanos derivatizado

Se añadió EDAC (4,4 mg) a Vi (4,6 mg) en una solución tamponada a pH 6,08 (1,5 ml de tampón MES 200 mM) y se dejó reaccionar durante 2 minutos a temperatura ambiente.

- 50 Se dejó reaccionar toxoide de tétanos derivatizado (9,2 mg) en una solución tamponada a pH 7,0 (1,5 ml de tampón MES 5 mM) con el Vi activado durante 3 horas a temperatura ambiente ($[TT_{ADH}] = 3,15 \text{ mg ml}^{-1}$, $[Vi] = 1,53 \text{ mg ml}^{-1}$, relación TT_{ADH}/Vi (p) = 2, $[EDAC] = 1,5 \text{ mg ml}^{-1}$).

Se dializó la mezcla de reacción frente a NaCl 0,2 M, tampón fosfato 10 mM, pH 7,07, 4° C y se purificó mediante Sephacryl S-1000 (1,5 x 90 cm) en tampón fosfato 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7,00. Durante la purificación del conjugado se recogieron dos pools diferentes (véase la figura 7), que se caracterizaron por una MW diferente. Los perfiles de filtración de gel de Vi y de TT en Sephacryl S-1000 muestran (véase la figura 7 y la figura 8):

- 5
- la purificación de conjugado de la proteína libre es factible (pool 1).
 - la purificación del conjugado del sacárido libre no es factible (pool 2 – Vi libre co-eluye con el conjugado).

El pool 1 debería contener por tanto menos Vi libre que el pool 2.

10 La figura 9 muestra el perfil en Sephacryl S1000 (1,6 x 90 cm) de la proteína no conjugada con fosfato 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7 a una flujo de 0,2 ml/min. La figura 10 muestra el perfil en Sephacryl S1000 (en las mismas condiciones) de Vi libre.

Se dializaron los pools 1 y 2 frente a tampón de fosfato 2 mM pH 7,0 y sus contenidos eran como sigue:

Conjugado Vi-TT _{ADH}	Contenido en proteína (micro BCA)	Contenido en sacárido (naranja acridina)	Relación (p/p) sacárido/proteína
Pool 1	2,46 mg	1,02 mg	0,41
Pool 2	5,56 mg	3,73 mg	0,67

El conjugado se caracterizó por análisis SEC (véase la figura 11, 214 nm, gel TSK 6000; tampón fosfato 100 mM + NaCl 100 mM + 5% de CH₃CN, pH 7,0):

- 15
- PSVi-TT_{ADH} pool 1: polisacárido 26,8 µg/ml; proteína 64,64 µg/ml
 - PSVi-TT_{ADH} pool 2: polisacárido 82,8 µg/ml; proteína 123,68 µg/ml
 - PSVi: 1,4 mg/ml
 - TT_{ADH}: 0,1 mg/ml

Conjugación de Vi con CRM₁₉₇ derivatizado

20 Se prepararon tres lotes diferentes de Vi-CRM_{ADH} ("04", "05" y "06") como sigue:

25 Se añadió EDAC (4,4 mg) a Vi (4,6 mg, dando una relación molar EDAC:Vi de aproximadamente 1,43:1) en una solución tamponada a pH 6,0 (1,65 ml de tampón MES 20 mM) y se mezcló durante 2 minutos a temperatura ambiente. (En posteriores experimentos, a título comparativo, se redujo la cantidad de EDAC, usando relaciones molares de 5:1 y 9:1. Conjugados CRM₁₉₇ obtenidos con estos sacáridos derivatizados se caracterizaban mejor y eran reproducibles con < 5% de CRM-ADH no conjugado. La relación 5:1 era mejor que 1,4:1, y la relación 9:1 era mejor que 5:1).

30 Se dejó reaccionar CRM₁₉₇ derivatizado (9,2 mg) en una solución tamponada a pH 7,0 (1,085 ml de tampón MES 5 mM) con el Vi activado durante 3 horas a temperatura ambiente ($[CRM_{ADH}] = 3,07 \text{ mg ml}^{-1}$, $[Vi] = 1,53 \text{ mg ml}^{-1}$, relación CRM_{ADH}/Vi (p) = 2, $[EDAC] = 1,47 \text{ mg ml}^{-1}$), durante lo cual el pH se mantuvo a 6,0-6,20 usando tampón MES con el fin de evitar la precipitación.

Como se indicó anteriormente se añade CRM_{ADH} a tampón MES 5 mM, pH 7. Es necesario que la mezcla final sea en tampón MES no inferior a 50-60 mM a pH 6 para mantener el pH constante durante la reacción propiamente.

Se purificó la mezcla de reacción con columna Sephacryl S1000 (1,5 x 90 cm) en tampón de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7 a 4° C.

35 Como un medio alternativo de purificación se puede eliminar CRM_{ADH} del conjugado mediante ultrafiltración tangencial (membrana de 100K o 300K) como sigue: mezcla de reacción diluida de 15 a 50 ml con tampón fosfato 10 mM pH 7,2; membrana: Vivaflow 200 cm² 100K (celulosa regenerada); P_{ent}: 1,2-1,3 bar; P_{sal}: 0,4 bar; flujo: 22,4 ml/min; volumen de permeado: 1,4 l; (28 ciclos con tampón fosfato 10 mM pH 7,2); volumen de retenido final de 152 ml.

40 El conjugado se caracterizó por microBCA (contenido en proteína), valoración con naranja de acridina y RMN/HPAEC-PAD (contenido en sacárido), RMN ¹H (cuantificación del nivel de O-acetilo y de derivado de EDAC), HPLC y SDS-PAGE.

La figura 13 muestra la purificación del lote 06 en Sephacryl S-1000 (Sephacryl S1000 1,6 cm x 90 cm; flujo: 0,2 ml/min, eluyente: NaCl 200 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,0). Se recogieron fracciones (1-11 y 12-22 para lote 06) para cada lote en dos diferentes pools, distinguidos por MW. El primer pool (primeras fracciones) se purificó del sacárido libre, mientras que el segundo contenía una cantidad no determinada de sacárido libre.

- 5 Se dializaron los pools contra NaH₂PO 2 mM, pH 7,5, a 4° C, durante la noche y los contenidos eran:

Conjugado	Conc. de sacárido (µg/ml) HPAEC-PAD	Conc. de sacárido (µg/ml) naranja acridina	Conc. de proteína	Relación PS/proteína (p/p) HPAEC/PAD o naranja acridina		% de rendimiento en proteína	% de rendimiento en sacárido (HPAEC/PAD)
Vi-CRM _{ADH} lote 04 pool 1	24,37	32,75	52,06	0,47	0,63	64,90	84,31
Vi-CRM _{ADH} lote 04 pool 2	78,36	59,15	106,1	0,74	0,56		
Vi-CRM _{ADH} lote 05 pool 1	34,51	35,95	63,17	0,55	0,57	63,94	86,82
Vi-CRM _{ADH} lote 05 pool 2	71,39	64,6	93,42	0,76	0,69		
Vi-CRM _{ADH} lote 06 pool 1	39,12	29,55	59,1	0,66	0,5	56,89	86,23
Vi-CRM _{ADH} lote 06 pool 2	67,73	50	82,41	0,82	0,61		

Las figuras 15 a 17 muestran análisis SEC comparativos de aquellos pools (columna analítica de gel TSK 6000PW (TosoHaas) (7,5 mm x 30,0 cm), eluyente: NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, 5% de CH₃CN, pH 7,2; flujo: 0,5 ml/min; V₀: -13,5 min – V_t: -27,8 min).

Se filtró en condiciones de esterilidad el conjugado (0,22 µm), se tomaron alícuotas y se conservaron a -80° C (4° C).

10 Determinación de la actividad in vivo

Antígenos usados

Se usaron los conjugados Vi-Tt preparados en el ejemplo previo. Se prepare Vi-CRM_{ADH} lote 03 usando sustancialmente las mismas condiciones que Vi-CRM_{ADH} lotes 04 a 06. Se prepare también Vi-CRM_{ADH} lote 01 usando sustancialmente las mismas condiciones que Vi-CRM_{ADH} lotes 04 a 06, pero con la diferencia de que la relación CRM_{ADH}/Vi (p) era igual a 1. El suero de ratón hiperinmune inmunizado con Vi-rEPA se obtuvo del NIH.

15

Características del conjugado

Conjugado	Contenido en proteína (micro BCA)	Contenido en sacárido (naranja acridina)	Relación (p/p) sacárido/proteína
a) ViCRM _{ADH} lote 01	3,18 mg	3,65 mg	1,15
b) ViCRM _{ADH} lote 03 pool 2	4,13 mg	2,93 mg	0,71
c) ViTT _{ADH} pool 01	2,46 mg	1,02 mg	0,41
d) ViTT _{ADH} pool 2	5,56 mg	3,73 mg	0,67

Diseño del estudio

Grupo	Inmunización	Dosis (μg)	Nº inyecciones	Días de sangrado	Ruta
1	PBS	-	3	0, 14, 28, 42	SC
2	Vi	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
3	Vi + CRM _{ADH}	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
4	Vi + TT _{ADH}	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
5	Vi-CRM _{ADH} lote 01	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
6	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
7	Vi-TT _{ADH} pool 1	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
8	Vi-TT _{ADH} pool 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
9 ^a	Vi-CRM _{ADH} lote 01	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
10 ^a	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
11 ^a	Vi-TT _{ADH} pool 1	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
12 ^a	Vi-TT _{ADH} pool 2	2,5	3	0, 14, 28, 42	SC
13 ^b	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2	10	1-2-3	0, 14, 28, 42	SC
14 ^b	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2	10	1-2-3	0, 14, 28, 42	SC

a: se adyugaron los conjugados con alumbre

b: se adyuvó la primera inmunización con CFA, segunda y tercera inmunizaciones con IFA

Inmunizaciones

5 Se dividieron ratones hembra Balb/c en catorce grupo de ocho ratones cada uno y se inmunizaron por vía subcutánea con 2,5 μg de Vi, conjugado de Vi, o una mezcla física de Vi y proteína vehículo derivatizada con ADH. Solo los grupos 13 y 14 recibieron 10 μg de dosis de inmunización.

Se administraron tres inyecciones de 200 μl cada una cada dos semanas, con sangrados dos semanas tras cada inmunización.

10 Los grupos 9 y 12 recibieron alumbre como adyuvante, mientras que el adyuvante para los grupos 13 y 14 era adyuvante de Freund completo (CFA, primera inyección) y adyuvante de Freund incompleto (IFA, segunda y tercera inyección).

Procedimiento ELISA

15 Los pocillos de placas ELISA de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) se recubrieron con 100 μl de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Vi en tampón de carbonato (0,05 M, pH: 9,6) y se dejaron durante la noche a 4° C. Se purificó el Vi usado para recubrimiento de *Citrobacter freundii* WR7011. La mañana siguiente se bloquearon las placas con 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de leche desnatada al 5% en PBS-Tween 20 (PBST, 0,05%) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Después de lavar con PBST se incubaron 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de suero de ratón (1:200 diluido en PBST con BSA al 0,1%) durante 2 horas a RT. Después de tres lavados se incubó anticuerpo secundario anti-ratón IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma A3438, 1:10000 diluido en PBST, BSA al 0,1%) a 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ durante 1 hora a RT. Se disolvió el sustrato de fosfatasa alcalina (p-NPP, Sigma N2765) en tampón de dietanolamina (1 M, pH: 9,8) y se incubó después de otro lavado durante 2 hora a RT. Se leyeron las placas a 405 y 490 nm usando un lector ELISA. Los valores de absorbancia usados para determinación de unidades de anticuerpo se obtuvieron sustrayendo valores de 490 nm a valores de 405 nm. Se expresaron las unidades de anticuerpo en relación a un suero estándar anti-Vi de ratón hiperinmune, tras análisis Hill Plot.

25 Se usó un suero de ratón hiperinmune inmunizado con Vi-rEPA como control positivo interno.

ES 2 537 019 T3

Cada suero de ratón se experimentó por triplicado en tres diferentes placas ELISA y se presentaron los datos como medias aritméticas y desviaciones estándar. Se define una unidad de anticuerpo como lo recíproco de la dilución del suero convencional que da una densidad óptica igual a 1 en un ELISA convencional.

Valores de anticuerpo anti-CRM en grupos 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14

Grupo	Inmunización	Media			Desviación estándar		
		T14	T28	T42	T14	T28	T42
1	PBS	-0,41	-0,64	-0,77	0,12	0,14	0,09
2	Vi	-0,89	-0,58	-0,65	0,14	0,17	0,07
3	Vi + CRM	0,09	34,88	256,81	0,25	16,11	42,99
5	Vi-CRM _{ADH} lote 01	3,80	149,80	311,68	1,19	47,20	49,33
6	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2	7,30	163,06	550,38	2,64	50,91	44,70
9	Vi-CRM _{ADH} lote 01 / alumbre	14,86	379,57	721,00	5,98	49,88	34,96
10	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2 / alumbre	44,73	263,46	452,91	7,27	16,74	29,09
13	Vi-CRM _{ADH} lote 01	50,91	586,61	762,92	15,29	41,35	65,50
14	Vi-CRM _{ADH} lote 01	69,18	672,56	841,66	22,68	53,35	43,42

5

Valores de anticuerpo anti-Vi en todos los grupos

Grupo nº	Inmunización	Media			Desviación estándar		
		T14	T28	T42	T14	T28	T42
1	PBS	3,3	-1,03	-1,54	0,5	0,81	0,52
2	Vi	-3,4	-1,94	-0,04	0,4	0,52	0,52
3	Vi + CRM	5,0	-0,14	0,03	0,8	1,04	0,65
4	Vi + TT	1,1	2,51	1,31	1,3	1,23	0,39
5	Vi-CRM _{ADH} lote 01	53,7	242,20	191,53	8,4	31,40	40,50
6	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2	95,4	245,39	225,66	40,9	45,33	38,00
7	Vi-TT _{ADH} pool 1	75,5	170,20	160,49	18,0	27,17	34,25
8	Vi-TT _{ADH} pool 2	58,2	126,23	126,20	13,1	18,50	17,74
9	Vi-CRM _{ADH} lote 01 / alumbre	56,4	162,52	98,58	13,4	24,15	22,59
10	Vi-CRM _{ADH} lote 03 pool 2 / alumbre	58,7	98,92	93,22	18,8	24,87	30,55
11	Vi-TT _{ADH} pool 1 / alumbre	44,6	191,81	151,56	18,3	36,76	38,83
12	Vi-TT _{ADH} pool 2 / alumbre	68,1	202,99	180,09	18,0	24,89	21,73
13	Vi-CRM _{ADH} lote 01	65,3	271,48	264,39	16,3	33,38	63,96
14	Vi-CRM _{ADH} lote 01	134,5	202,51	234,78	32,2	86,61	64,27
	NIH			149,02			24,56

Los resultados se ilustran en la figura 18.

REFERENCIAS

- [1] Guzman y col. (2006) *Vaccine* 24(18): 3804-1 1.
- [2] Canh y col. (2004) *Infect Immun.* 72(11):6586-8.
- 5 [3] Kossaczka y col. (1997) *Infect Immun* 65(6):2088-93.
- [4] Clark y col. (1958) *J Biol Chem* 230:81-89.
- [5] Heyns y col. (1967) *Carbohydr Res* 3:340-353.
- [6] Heyns y col. (1959) *Chem Ber* 92:2435-2438.
- [7] Webster y col. (1954) *Arch Biochem Biophys* 50:223-224.
- 10 [8] Webster y col. (1954) *J Immunol* 73: 16-22.
- [9] Whiteside y col. (1961) *J Immunol* 86:538-542.
- [10] Kao y col. (2004) *Vaccine* 22:335-344.
- [11] Szu y col. (1991) *Infect Immun* 59(12):4555-61.
- [12] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- 15 [13] Szu y col. (1994) *Infect Immun* 62(12): 5545-9.
- [14] Documento WO 96/011709.
- [15] Documento US-A-2005/0106181.
- [16] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55: 1573-1579.
- [17] Documento WO98/32873.
- 20 [18] European patent 0072513.
- [19] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36
- [20] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34: 163-8
- [21] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 113-33, vii
- [22] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567
- 25 [23] Documento EP-B-O 477 508
- [24] Patente de Estados Unidos 5,306,492
- [25] Documento WO98/42721
- [26] Dick y col. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basilea, 1989, Vol. 10, 48-1 14
- [27] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego CA (1996)
- 30 [28] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251): 195-6
- [29] Documento WO99/42130
- [30] Documento WO98/42721
- [31] Patente de Estados Unidos 4.882.317
- [32] Patente de Estados Unidos 4.695.624
- 35 [33] *Mol. Immunol*, 1985, 22, 907-919
- [34] Documento EP-A-0208375

- [35] Bethell G.S. y col, J. Biol Chem., 1979, 254, 2572-4
- [36] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
- [37] Patente de Estados Unidos 4.965.338
- [38] Documento WOOO/ 10599.
- 5 [39] Gevert y col., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [40] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
- [41] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [42] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
- [43] Patente de Estados Unidos 5.204.098
- 10 [44] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
- [45] Documento WO2007/000343.
- [46] Szu y col. (1987) J Exp Med 1166(5): 1510-24.
- [47] Research Disclosure, 453077 (Enero 2002)
- [48] Documento EP-A-0372501.
- 15 [49] Documento EP-A-0378881.
- [50] Documento EP-A-0427347.
- [51] Documento WO93/17712
- [52] Documento WO94/03208.
- [53] Documento WO98/58668.
- 20 [54] Documento EP-A-0471 177.
- [55] Documento WO91/01146
- [56] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31 :3816-3824.
- [57] Baraldo y col. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
- [58] Documento EP-A-0594610.
- 25 [59] Ruan y col. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
- [60] Documento WO00/56360.
- [61] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63 : 2706- 13.
- [62] Michon y col. (1998) Vaccine. 16:1732-41.
- [63] Documento WO02/091998.
- 30 [64] Documento WO01/72337
- [65] Documento WO00/61761.
- [66] Documento WO00/33882
- [67] Documento WO99/42130
- [68] Documento WO96/40242
- 35 [69] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Phannacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [70] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.

- [71] Patente de Estados Unidos 6355271.
[72] Documento WO00/23105.
[73] Documento US 5.057.540.
[74] Documento WO96/33739.
- 5 [75] Documento EP- A-0109942.
[76] Documento WO96/1 1711.
[77] Documento WO00/07621.
[78] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
[79] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- 10 [80] Pizza y col. (2000) *IntJMed Microbiol* 290:455-461.
[81] Documento WO95/17211.
[82] Documento WO98/42375.
[83] Singh y col] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
[84] Documento WO99/27960.
- 15 [85] Documento US 6.090.406
[86] Documento US 5.916.588
[87] Documento EP-A-0626169.
[88] Dyakonova y col. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13): 1615-23.
[89] FR-2859633.
- 20 [90] De Libero y col, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496
[91] Patente de Estados Unidos 5.936.076.
[92] Oki y col, *J. Clin. Investig.*, 1 13: 1631-1640
[93] Documento US2005/0192248
[94] Yang y col, *Angew. Chem. Int. Ed*, 2004, 43: 3818-3822
- 25 [95] Documento WO2005/102049
[96] Goff y col, *J. Am. Chem., Soc*, 2004, 126: 13602-13603
[97] Documento WO03/105769
[98] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
[99] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31 :2393-2400.
- 30 [100] Documento WO02/26757.
[101] Documento WO99/62923.
[102] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
[103] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179- 185.
[104] Documento WO98/40100.
- 35 [105] Patente de Estados Unidos 6.207.646.
[106] Patente de Estados Unidos 6.239.116.

- [107] Patente de Estados Unidos 6.429.199.
- [108] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
- [109] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- [110] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- 5 [111] Documento WO01/95935.
- [112] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306:948-953.
- [113] Bhagat y col. (2003) BBRC 300:853-861.
- [114] Documento WO03/035836.
- [115] Documento WO01/22972.
- 10 [116] Schellack y col. (2006) Vaccine 24:5461-72.
- [117] Myers y col. (1990) páginas 145- 156 de Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.
- [118] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de referencia 156.
- [119] Johnson y col. (1999) J Med Chem 42:4640-9.
- [120] Baldrick y col. (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413.
- 15 [121] Documento WO 94/21292.
- [122] Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8): 1177-86.
- [123] Documento WO2004/064715.
- [124] Documento US 4.680.338.
- [125] Documento US 4.988.815.
- 20 [126] Documento WO92/15582.
- [127] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [128] Wu y col. (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83.
- [129] Vasilakos y col. (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74.
- 25 [130] Patentes de Estados Unidos 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
- [131] Jones (2003) Curr OpinInvestigDrugs 4:214-218.
- [132] Documento WO2004/060308.
- 30 [133] Documento WO2004/064759.
- [134] Documento US 6.924.271.
- [135] Documento US2005/0070556.
- [136] Documento US 5.658.731.
- [137] Patente de Estados Unidos 5.011.828.
- 35 [138] Documento WO2004/87153.
- [139] Documento US 6.605.617.
- [140] Documento WO02/18383.
- [141] Documento WO2004/018455.

- [142] Documento WO03/082272.
- [143] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [144] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [145] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19: 109- 115.
- 5 [146] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31 : 185- 196.
- [147] Documento WO03/011223.
- [148] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21 :2485-2491.
- [149] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21 :836-842.
- [150] Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- 10 [151] Documento US2005/0215517.
- [152] Documento WO90/14837.
- [153] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [154] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- 15 [155] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (ed. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [156] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [157] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [158] Hariharan y col. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- 20 [159] Documento WO95/11700.
- [160] Patente de Estados Unidos 6.080.725.
- [161] Documento WO2005/097181.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un conjugado de Vi que comprende las etapas de:
 - a) combinación simultánea de un ácido adípico y conector de dihidrazida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y una proteína vehículo;
 - 5 b) eliminación de cualquier conector en exceso del producto de la etapa a);
 - c) hacer reaccionar Vi con EDAC a una relación molar de Vi:EDAC de $\geq 5:1$; y
 - d) hacer reaccionar el producto de la etapa b) con el producto de la etapa c).
- 10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación molar Vi:EDAC es $\geq 9:1$.
3. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el conector en exceso se elimina por diálisis.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína vehículo es bien CRM 197 o bien toxoide de tétanos.
- 15 5. Un conjugado que se puede obtener con un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
6. Un conjugado que comprende Vi unido a CRM197.
7. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el Vi se une al CRM 197 mediante un conector de dihidrazida de ácido adípico (ADH).
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la composición no está coadyuvada o en la que la composición comprende además un adyuvante.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 o reivindicación 9, que comprende solución salina.
- 25 11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que una dosis unidad de la composición incluye 5 μg de sacárido Vi.
12. Un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para uso en un procedimiento para el aumento de una respuesta inmune en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración del conjugado al mamífero.
- 30 13. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para uso en un procedimiento para aumento de una respuesta inmune en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración de la composición farmacéutica al mamífero.

FIGURA 1

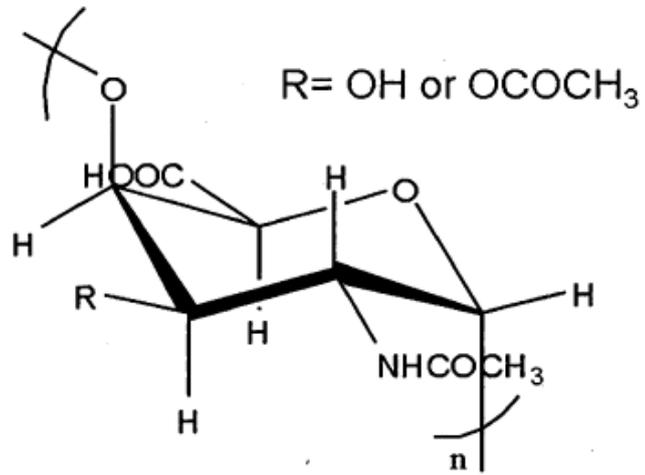


FIGURA 2

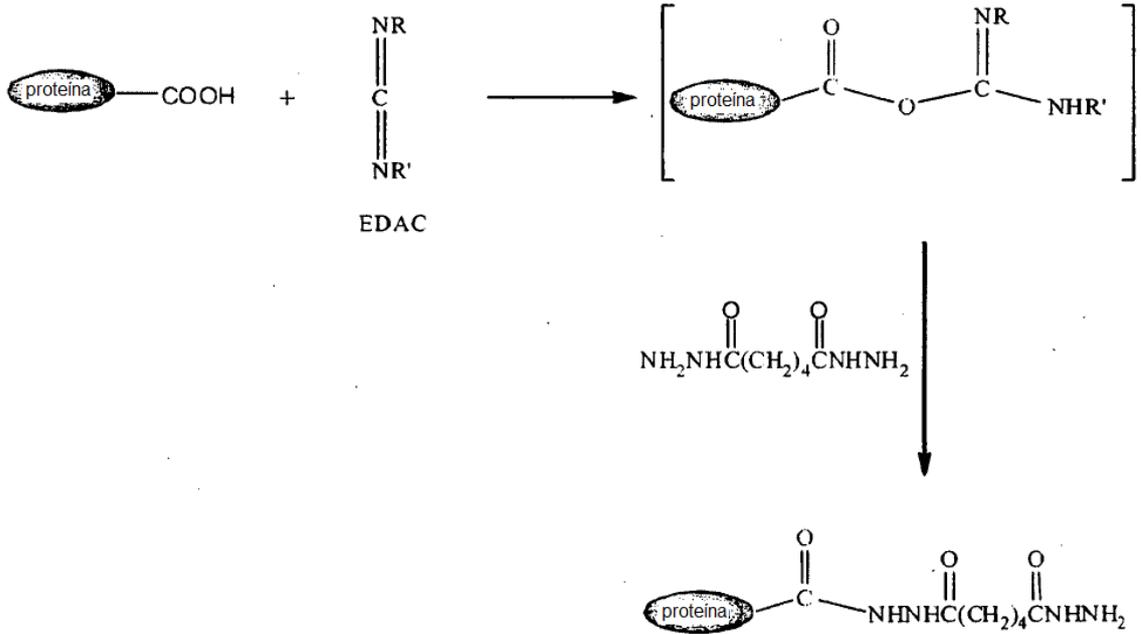


FIGURA 3

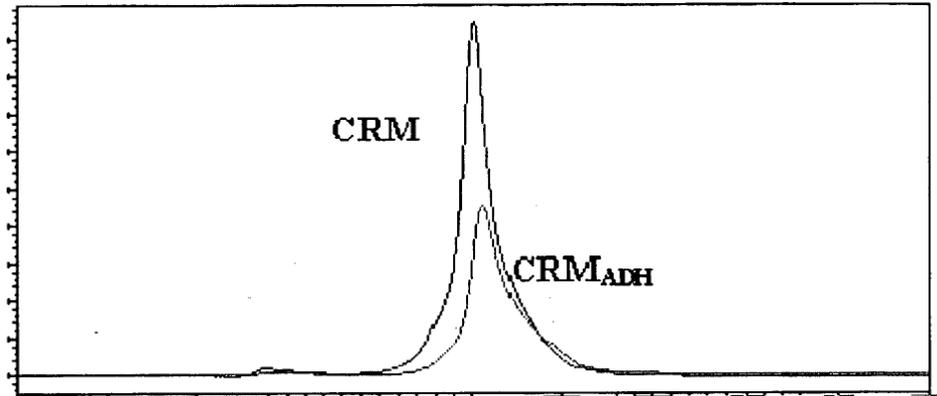


FIGURA 4

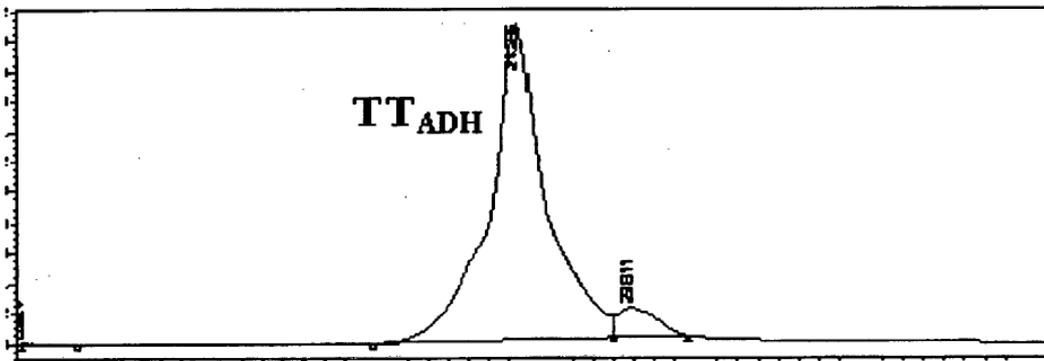


FIGURA 5

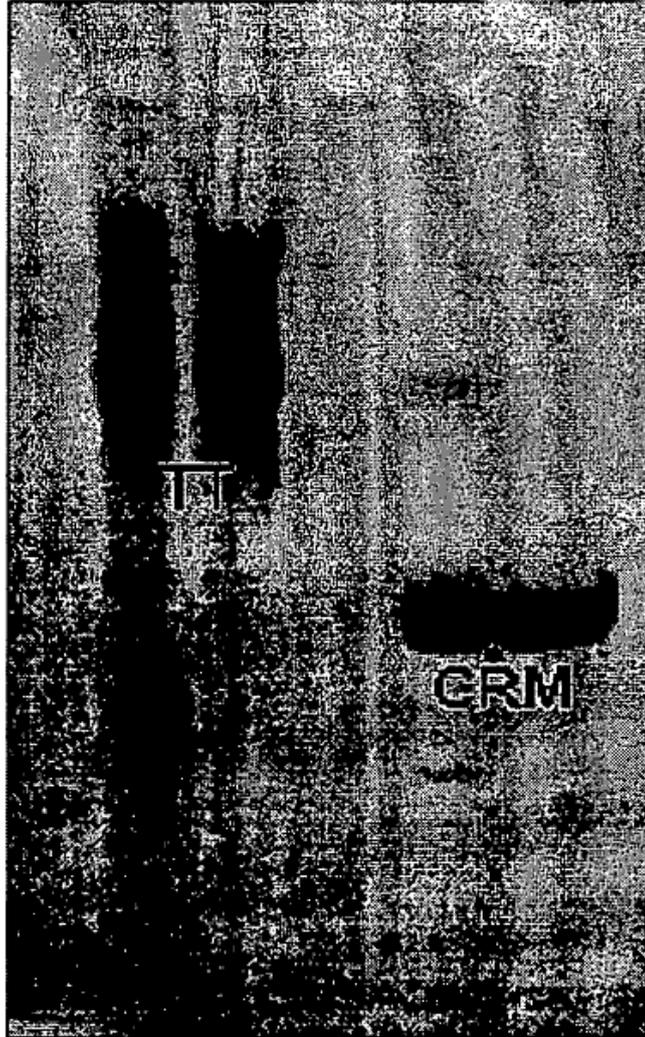


FIGURA 6

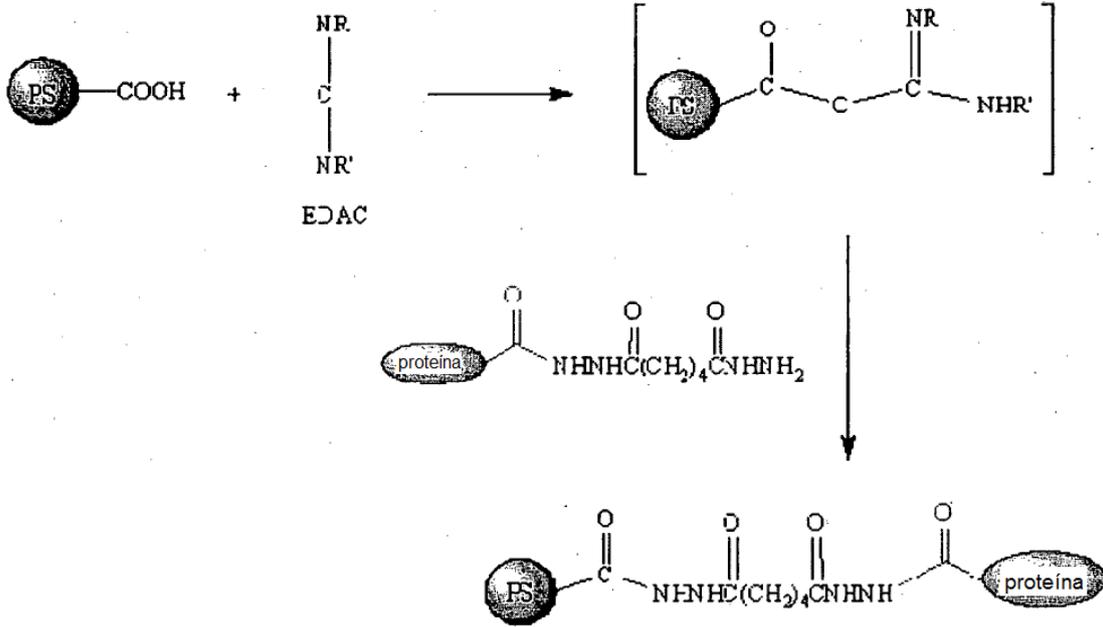


FIGURA 7

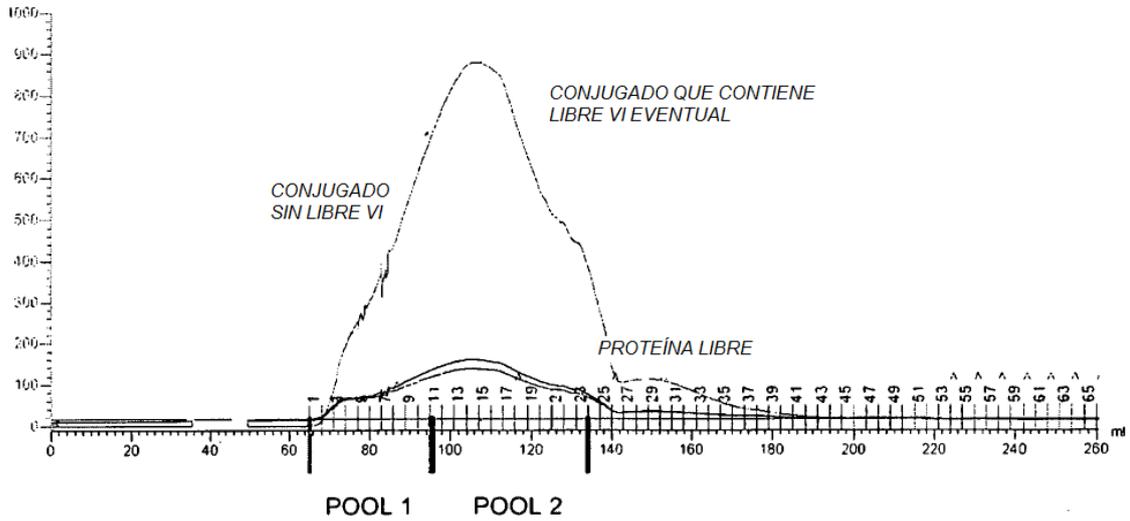


FIGURA 8

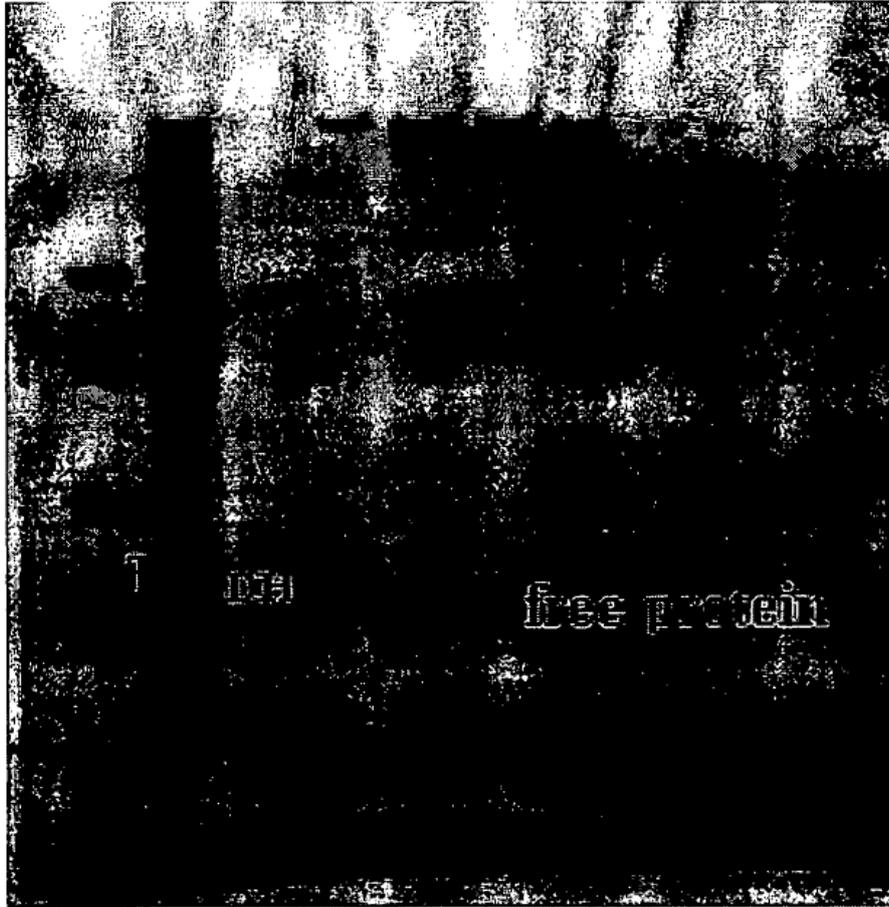


FIGURA 9

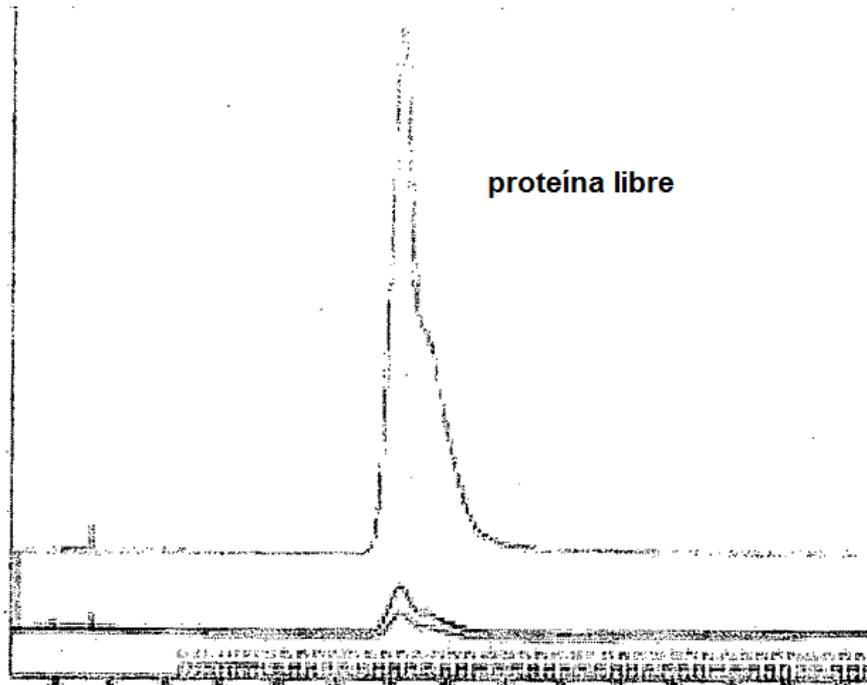


FIGURA 10

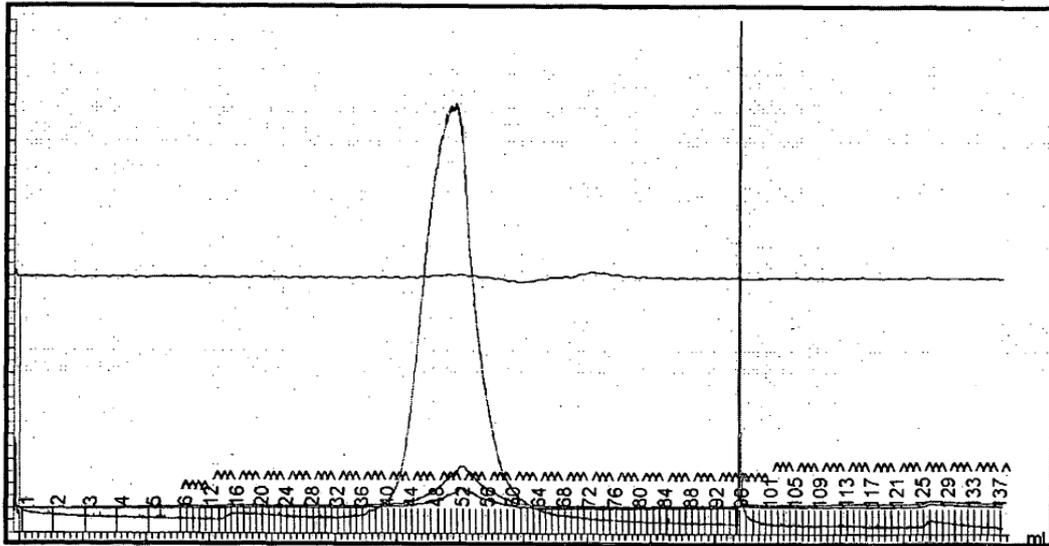


FIGURA 11

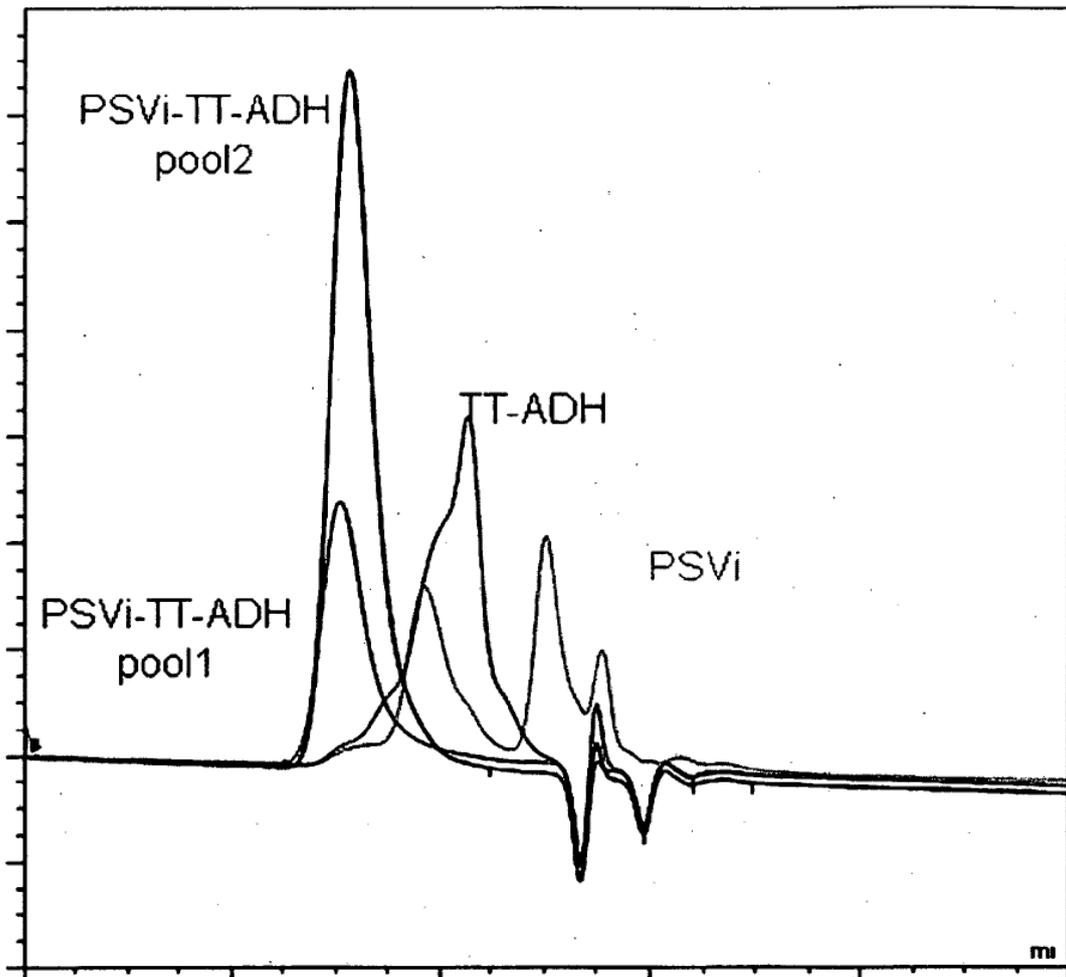


FIGURA 12

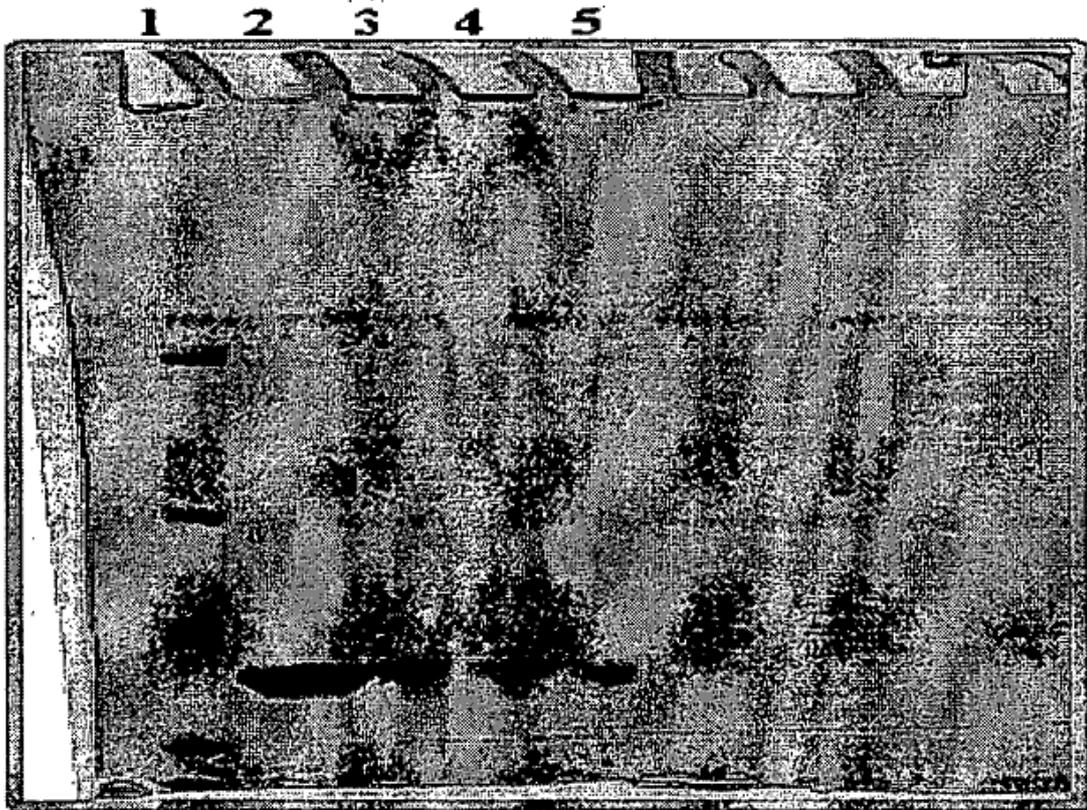


FIGURA 13

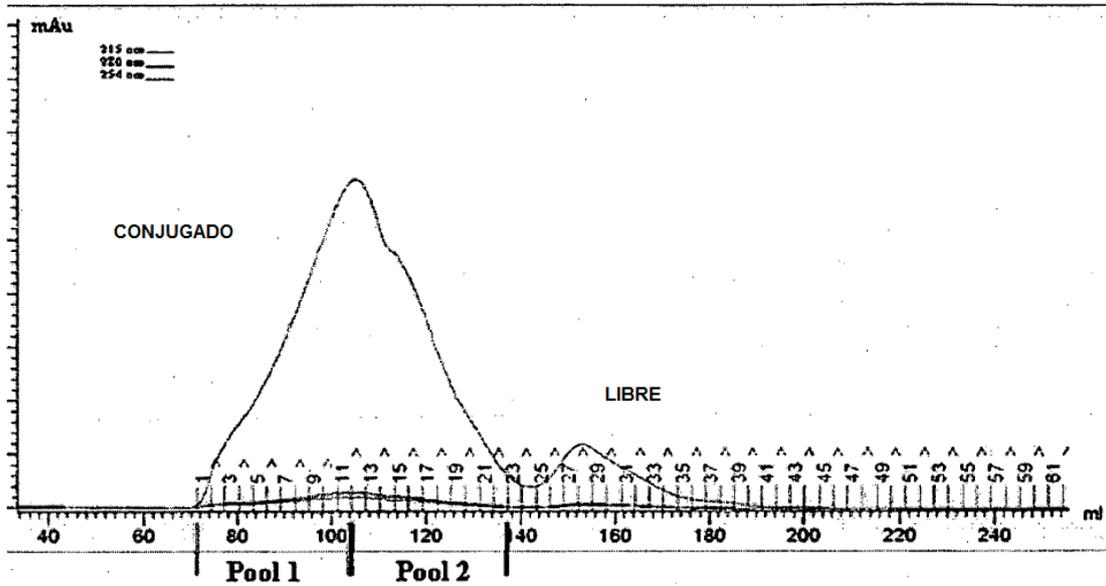


FIGURA 14



FIGURA 15

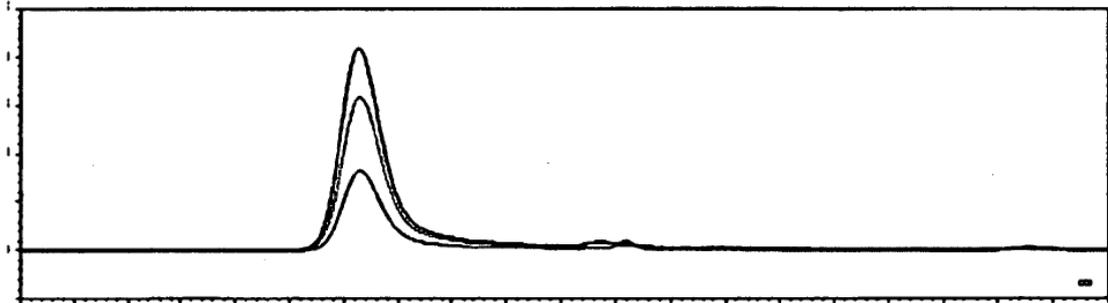
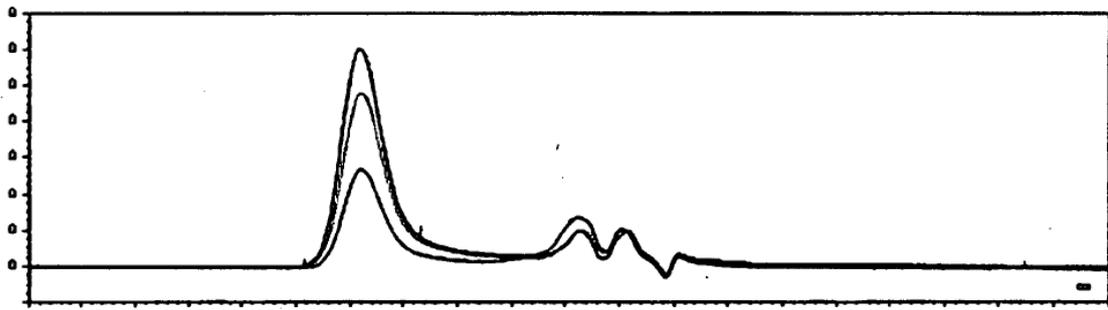
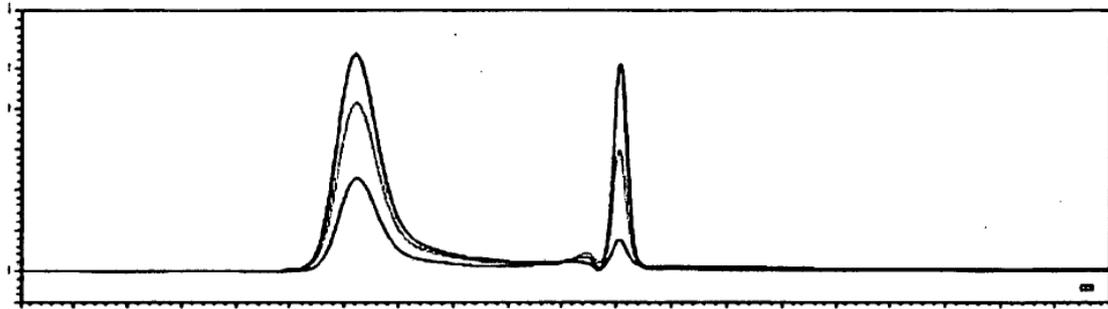


FIGURA 16

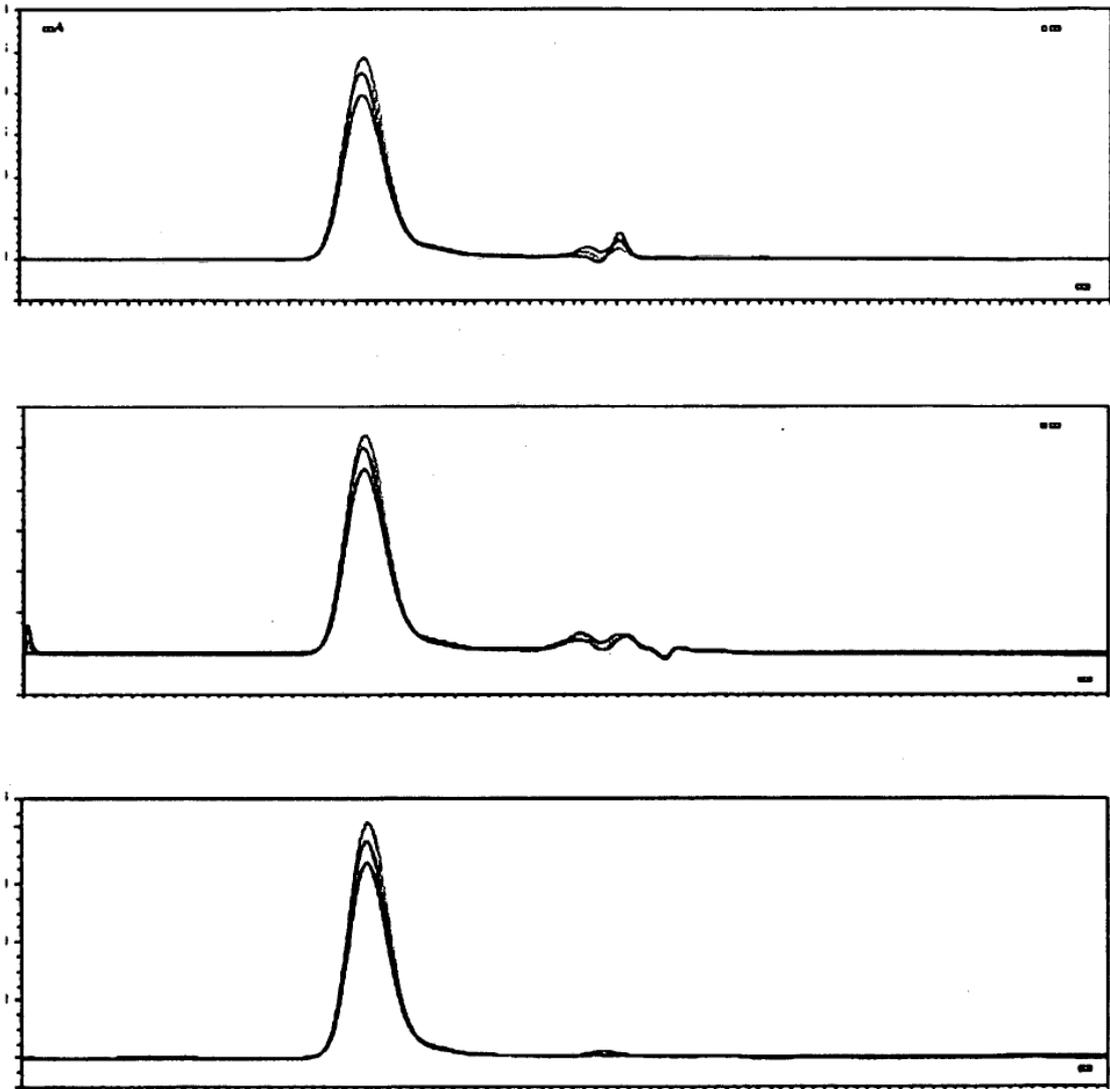


FIGURA 17

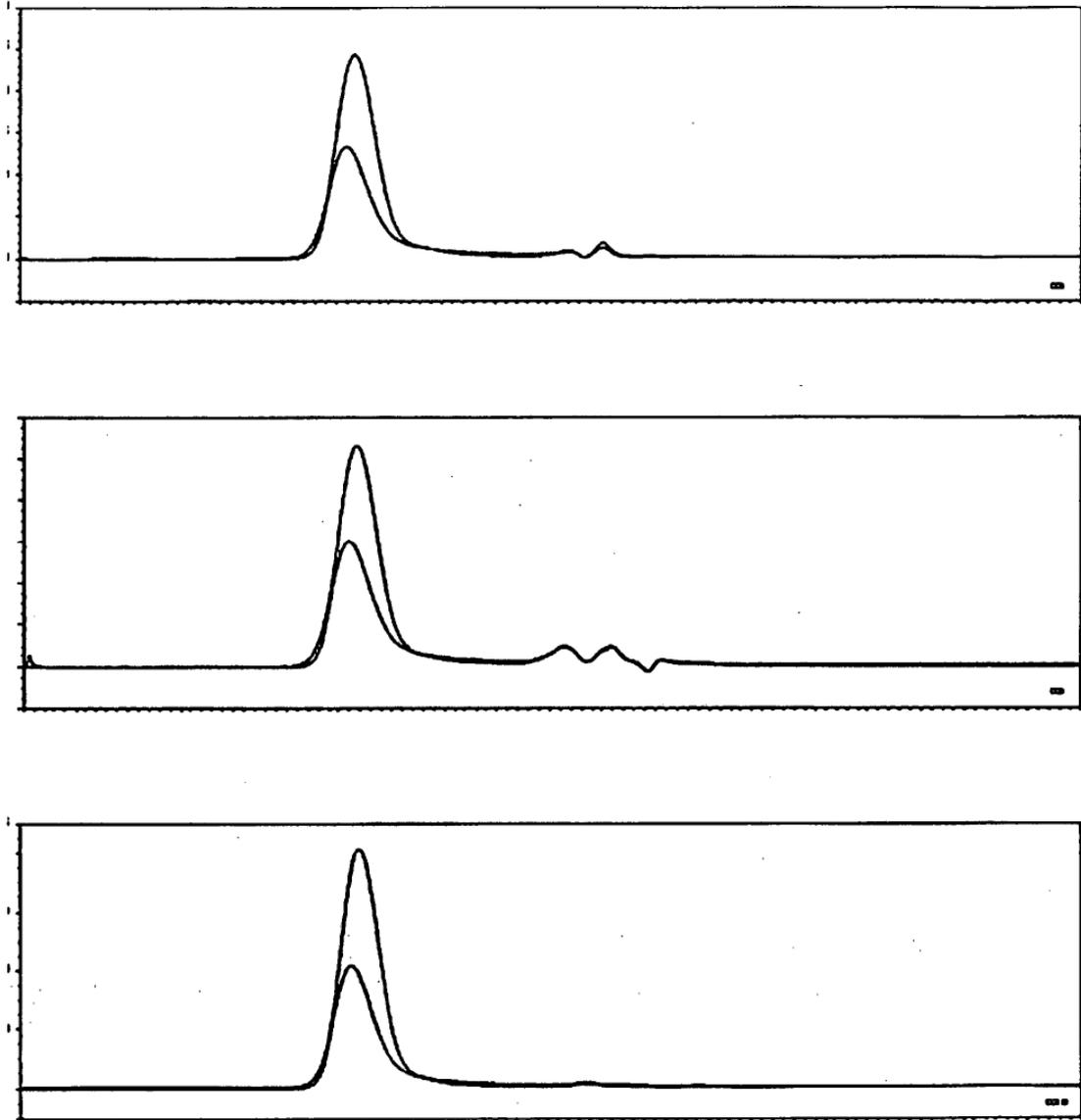


FIGURA 18

FIGURA 18A

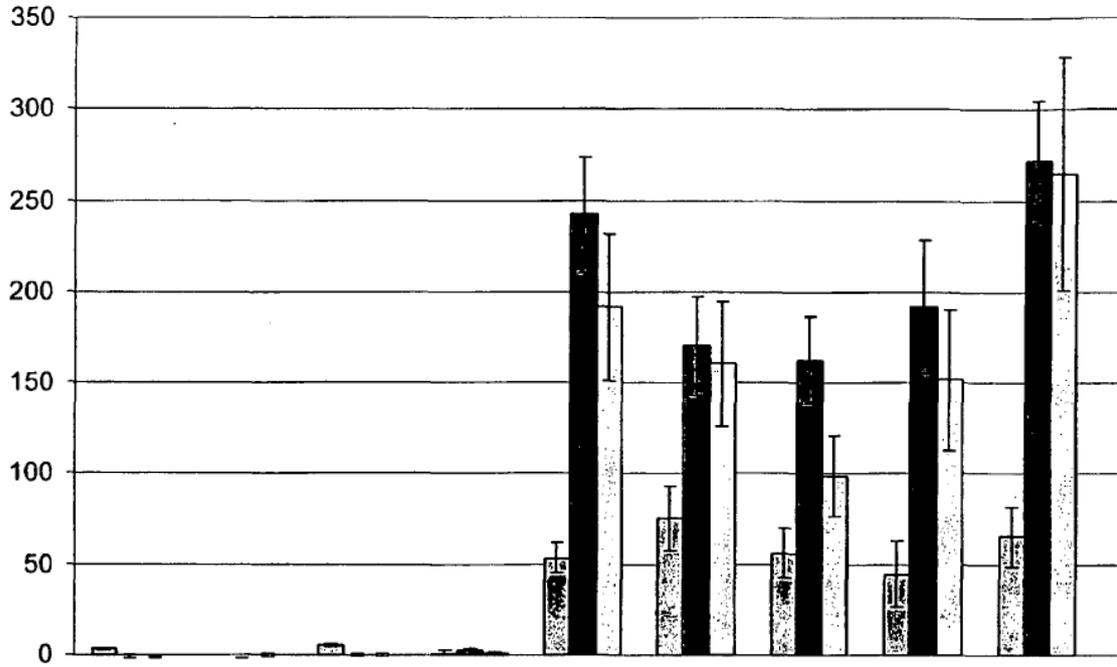


FIGURA 18B

