

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 996**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2013 PCT/EP2013/070496**
87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053521**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2013 E 13771153 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2903650**

54 Título: **Conjugados de sacáridos no lineales**

30 Prioridad:

02.10.2012 US 201261709093 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERTI, FRANCESCO;
BROGIONI, GIULIA;
COSTANTINO, PAOLO;
DEL GIUDICE, GIUSEPPE y
ROMANO, MARIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 672 996 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

Conjugados de sacáridos no lineales

Solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 61/709.093, enviada el 2 de octubre de 2012.

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a la inmunización usando conjugados de sacáridos no lineales que comprenden polisacáridos u oligosacáridos que se enlazan a al menos dos péptidos vehículo que comprenden epítomos de linfocitos T y no tienen epítomos de linfocitos B conformacionales donde uno de los péptidos vehículo se enlaza a un sacárido interno. De interés particular es el uso de dichas composiciones como vacunas contra infecciones y enfermedades bacterianas y fúngicas. La presente invención también se refiere a la inmunización usando conjugados de sacáridos lineales que comprenden polisacáridos u oligosacáridos que se enlazan a al menos un péptido vehículo que comprende al menos dos epítomos de linfocitos T PV1 y no tiene epítomos conformacionales de linfocitos B.

15 Antecedentes de la técnica

Las proteínas vehículo se usan para mejorar la respuesta inmune a los inmunógenos de polisacáridos. Dichas proteínas vehículo pueden ser particularmente ventajosas en la inducción de una respuesta inmune desde muy jóvenes y por lo tanto se encuentra en un número de vacunas pediátricas. El calendario de inmunización pediátrica recomendado incluye un número significativo de vacunas que incluyen la vacuna de la hepatitis B en el nacimiento; empezando a las seis semanas, todas de difteria/tétanos/pertusis (DTaP), rotavirus, conjugado de *H. influenzae* tipo b (Hib), virus de la polio inactivado y conjugados neumocócicos; empezando a los seis meses, vacunas de la gripe inactivadas; empezando a los 12 meses, sarampión/paperas/rubeola (MMR, por sus siglas en inglés), varicela y hepatitis A; y después de dos años, el conjugado meningocócico. Entre esta lista, los siguientes son conjugados de polisacáridos: conjugado Hib (por ejemplo, VaxemHib - un conjugado de difteria CRM₁₉₇); conjugados neumocócicos (por ejemplo, Prevnar - un conjugado de difteria CRM₁₉₇); y el conjugado meningocócico (por ejemplo, Menveo - un conjugado de difteria CRM₁₉₇).

20 Añadir nuevas vacunas al actual calendario de inmunización pediátrica puede encontrarse con dos problemas potenciales que deben abordarse. En primer lugar, debe abordarse el problema de la supresión epitópica inducida por vehículo (o "supresión por vehículo", como se conoce generalmente), en particular la supresión que surge del cebado del vehículo. La "supresión de vehículo" es el fenómeno por el que la pre-inmunización de un animal con una proteína vehículo lo previene de que más tarde se provoque una respuesta inmune contra un nuevo epítipo antigénico que se presenta en ese vehículo (Herzenberg y col. (1980) *Nature* 285: 664-667).

30 Como se informa en Schutze y col (1985) *J Immunol* 135:2319-2322, cuando varios antígenos de vacuna contienen el mismo componente proteico (usándose como un inmunógeno y/o como proteína vehículo en un conjugado) entonces está el potencial de interferencia entre esos antígenos. Schutze y col observaron que la respuesta inmune contra un antígeno que se conjugó a un vehículo del toxoide tetánico (Tt) se suprimió por una inmunidad pre-existente contra Tt.

40 Dagan y col. observaron que una combinación de vacunas DTP con una vacuna de conjugado Hib se afectó adversamente cuando el vehículo para el conjugado Hib era el mismo que el antígeno del tétanos de la vacuna DTP ((1998) *Infect Immun* 66:2093-2098). Dagan y col. concluyeron que este fenómeno de "supresión de vehículo", que surge de la interferencia por un vehículo de proteína común, debe tomarse en cuenta cuando se introducen vacunas que incluyen múltiples conjugados.

45 Por el contrario a Schutze y col y Dagan y col., Barington y col. informaron que el cebado con el toxoide tetánico no tuvo impacto negativo en la respuesta inmune contra un conjugado Hib-Tt administrado posteriormente, pero se vio supresión en pacientes con anticuerpos anti-Tt adquiridos maternamente ((1994) *Infect Immun* 62:9-14). Di John y col, sin embargo, observaron un efecto de "supresión epitópica" para un conjugado peptídico basado en Tt en pacientes que tenían anticuerpos anti-Tt existentes que resultaban de la vacunación del tétanos ((1989) *Lancet* 2(8677):1415-8).

50 Granoff y col. sugirieron que un conjugado que tenía CRM₁₉₇ (un mutante detoxificado de la toxina diftérica) como el vehículo podía ser ineficaz en niños que no habían recibido previamente la toxina diftérica como parte de una vacuna (por ejemplo, como parte de una vacuna DTP o DT) ((1993) *Vaccine Suppl* 1: S46-51). Este trabajo se desarrolló adicionalmente en Granoff y col. (1994) *JAMA* 272:1116-1121, donde se vio que un efecto de cebado del vehículo por inmunización D-T persistía durante la posterior inmunización con conjugados Hib.

55 En Barington y col. (1993) *Infect Immun* 61:432-438, los autores descubrieron que la pre-inmunización con una proteína vehículo de difteria o del toxoide tetánico redujo el aumento de los niveles de anticuerpo anti-Hib después de una posterior inmunización con el sacárido capsular Hib conjugado a esos vehículos, viéndose igualmente afectadas IgG1 e IgG2. Las respuestas a las porciones vehículo de los conjugados también se suprimieron.

Adicionalmente, se vio una supresión más general no específica de epítipo, ya que se vio que la pre-inmunización con un conjugado afectó a las respuestas inmunes tanto contra el vehículo como a porciones de sacárido de un segundo conjugado que se administró cuatro semanas después.

De esta manera, dada la confusión sobre el impacto de la “supresión de vehículo”, tener proteínas vehículo adicionales disponibles para la conjugación sería beneficioso para reducir dichas interacciones adversas. De forma ideal, una proteína vehículo debe inducir un fuerte efecto ayudante a un epítipo de linfocito B conjugado (por ejemplo polisacárido) sin inducir una respuesta de anticuerpo contra sí mismo. Como una alternativa a las proteínas vehículo, el uso de epítopos peptídicos universales, que son inmunogénicos en el contexto de la mayoría de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Es un enfoque hacia esta meta [véase, por ejemplo, Alexander y col. (2000) *J Immunol* 164:1625-1633]. Dichos epítopos peptídicos se han identificado dentro de TT y otras proteínas. Sin embargo, el uso de epítopos únicos fue típicamente insuficiente para inducir una respuesta inmune dependiente de linfocitos T fuerte. Para abordar esto, se demostró que los péptidos vehículo de poliepítipo que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T, pero que carecen de epítopos conformacionales de linfocitos B, son particularmente útiles como vehículos tanto para sacáridos individuales así como para combinaciones de sacáridos de distintos patógenos. Adicionalmente, se ha descubierto que se ve solamente una baja respuesta inmunogénica contra este péptido vehículo poliepítipo incluso aunque comprenda un número de epítopos patogénicos conocidos, mientras que se habría esperado que la respuesta inmunogénica aumentaría proporcionalmente al número de epítopos patogénicos [véase, por ejemplo, la Publ. De Patente de EE.UU. 2008/0260773].

En segundo lugar, dado el calendario de inmunización ya lleno, la adición de nuevas vacunas al calendario de inmunización se volvería muy difícil en aumento debido a posibles interacciones adversas, pero también debido simplemente al número de inyecciones separadas requeridas. De esta manera, ser capaces de combinar vacunas en una única inyección tales como las vacunas DTaP o MMR es ventajoso. Tener péptidos vehículo adicionales que puedan potenciar una respuesta inmune a un inmunógeno de polisacárido sin inducir una respuesta inmune a sí mismo será beneficioso ya que puede simplificar la adición de nuevas vacunas basadas en sacáridos con vacunas existentes en una única composición inyectable. El documento WO2004/041310 desvela un conjugado que comprende un polisacárido/oligosacárido (E) tal como un polisacárido capsular bacteriano enlazado a través de un dendrímero a una sustancia inmunomoduladora. Es un objeto de la invención proporcionar péptidos adicionales y/o mejores para la conjugación a inmunógenos de polisacárido y mejores modos de conjugación para distribuir los epítopos peptídicos a lo largo de la longitud del polisacárido.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones. En una realización, la divulgación proporciona composiciones que incluyen un conjugado de sacárido no lineal que con un sacárido seleccionado de un polisacárido y un oligosacárido que se enlaza a al menos dos péptidos vehículo, donde los al menos dos péptidos vehículo tienen cada uno al menos un epítipo de linfocito T, pero no tienen epítopos conformacionales de linfocitos B y al menos uno de los al menos dos péptidos está enlazado internamente al sacárido. En ciertos casos, los al menos dos péptidos incluyen un epítipo lineal de linfocito B. En otros casos, los al menos dos péptidos no incluyen un epítipo lineal de linfocito B. Al menos uno de los al menos dos péptidos tiene un epítipo PV1 de linfocito T. En ciertos casos que tienen un epítipo PV1 de linfocito T, la secuencia de aminoácido comprende SEQ ID NO: 9, que opcionalmente tiene 1, 2, 3, 4 o 5 alteraciones de aminoácidos únicos. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, los al menos dos péptidos tienen la misma secuencia de aminoácidos o diferentes secuencias de aminoácidos. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, los al menos dos péptidos se enlazan directamente al sacárido o los al menos dos péptidos se enlazan al sacárido a través de un enlazador. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores con un enlazador, los enlazadores para los al menos dos péptidos son los mismos o son diferentes. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores con un enlazador, el enlazador es lineal (por ejemplo, alquiles de cadena recta con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀)). En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores con un enlazador, el enlazador es hidrazida-TFA de ácido N-kappa-maleimidoundecanoico (KMUH) o hidrazida-TFA de ácido N-β-maleimidopropiónico (BMPH). En ciertos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido no se enlaza a una proteína vehículo. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido se conecta a al menos un péptido por cinco a treintaicinco sacáridos, al menos un péptido por cinco a veinte sacáridos, o al menos un péptido por siete a quince sacáridos. En ciertos casos que puede combinarse con los casos anteriores, el sacárido se conecta a al menos tres péptidos, al menos cuatro péptidos, al menos cinco péptidos, al menos seis péptidos, al menos siete péptidos, al menos ocho péptidos, al menos nueve péptidos o al menos diez péptidos. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido es un sacárido capsular tal como de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Y. enterocolitica*, *V. cholerae* o *S. typhi*. En otros casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido es un glucano tal como de *C. albicans*, *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Pythium insidiosum*. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido comprende al menos diez sacáridos, al menos quince sacáridos, al menos veinte sacáridos, al menos veinticinco sacáridos, al menos treinta sacáridos, al menos treintaicinco sacáridos, al menos cuarenta sacáridos, al menos

cincuenta sacáridos, al menos setentaicinco sacáridos o al menos cien sacáridos. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, la composición también incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, la composición también incluye un adyuvante. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, la composición también incluye un componente adicional seleccionado de: un antígeno de *Neisseria meningitidis*, un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, un antígeno de *Streptococcus pyogenes*, un antígeno de *Moraxella catarrhalis*, un antígeno de *Bordetella pertussis*, un antígeno de *Staphylococcus aureus*, un antígeno de *Staphylococcus epidermidis*, un antígeno de *Clostridium tetani*, un antígeno de *Corynebacterium diphtheriae*, un antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), un antígeno de *Pseudomonas aeruginosa*, un antígeno de *Legionella pneumophila*, un antígeno de *Streptococcus agalactiae*, un antígeno de *Neisseria gonorrhoeae*, un antígeno de *Chlamydia trachomatis*, un antígeno de *Treponema pallidum*, un antígeno de *Haemophilus ducreyi*, un antígeno de *Enterococcus faecalis*, un antígeno de *Enterococcus faecium*, un antígeno de *Helicobacter pylori*, un antígeno de *Staphylococcus saprophyticus*, un antígeno de *Yersinia enterocolitica*, un antígeno de *E. coli*, un antígeno de *Bacillus anthracis*, un antígeno de *Yersinia pestis*, un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*, un antígeno de *Rickettsia*, un antígeno de *Listeria monocytogenes*, un antígeno de *Chlamydia pneumoniae*, un antígeno de *Vibrio cholerae*, un antígeno de *Salmonella typhi*, un antígeno de *Borrelia burgdorferi*, un antígeno de *Porphyromonas gingivalis*, un antígeno de *Shigella* y un antígeno de *Klebsiella*.

Otro aspecto de la divulgación incluye procedimientos para inducir una respuesta inmune que comprende la administración de la composición del aspecto anterior y cualquiera de sus diversos casos a un sujeto. En ciertos casos, el sujeto es humano. En algunos casos, que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune reconoce el sacárido. En algunos casos que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune al sacárido es más dependiente de linfocitos T que una respuesta inmune inducida por el sacárido sin enlazar a proteínas vehículo o a otros epítomos de linfocitos T.

Otro aspecto de la divulgación incluye el uso de la composición del aspecto anterior y cualquiera de sus diversos casos para inducir una respuesta inmune potenciada al sacárido en un sujeto mamífero. En ciertos casos, el sujeto mamífero es humano. En algunos casos que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune potenciada reconoce al sacárido. En algunos casos que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune potenciada al sacárido es más dependiente de linfocitos T que una respuesta inmune inducida por el sacárido sin enlazar a proteínas vehículo o a otros epítomos de linfocitos T.

Aún otro aspecto de la presente divulgación incluye composiciones que incluyen un conjugado de sacárido que comprende un sacárido seleccionado de un polisacárido y un oligosacárido, en el que el sacárido se enlaza a un péptido que comprende al menos dos epítomos de linfocito T que no tienen epítomos conformacionales de linfocitos B y en el que al menos uno de los epítomos de linfocitos T incluye el epítomo PV1. En ciertos casos, el péptido incluye un epítomo lineal de linfocito B. En otros casos, el péptido no incluye un epítomo lineal de linfocito B. En algunos casos que pueden combinarse con cualquiera de los casos anteriores, la secuencia de aminoácido del epítomo PV1 comprende SEQ ID NO: 9, que opcionalmente tiene 1, 2, 3, 4 o 5 alteraciones de aminoácidos únicos. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el péptido se enlaza directamente al sacárido o el péptido se enlaza al sacárido a través de un enlazador. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores con un enlazador, el enlazador es el mismo o son diferentes. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores con un enlazador, el enlazador es lineal (por ejemplo, alquiles de cadena recta con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀)). En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores con un enlazador, el enlazador es hidrazida-TFA de ácido N-kappa-maleimidoundecanoico (KMUH) o hidrazida-TFA de ácido N-β-maleimidopropiónico (BMPH). En ciertos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido no se enlaza a una proteína vehículo. En ciertos casos que puede combinarse con los casos anteriores, el péptido tiene al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez epítomos de linfocitos T. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido es un sacárido capsular tal como de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Y. enterocolitica*, *V. cholerae* o *S. typhi*. En otros casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido es un glucano tal como de *C. albicans*, *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Pythium insidiosum*. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, el sacárido comprende al menos diez sacáridos, al menos quince sacáridos, al menos veinte sacáridos, al menos veinticinco sacáridos, al menos treinta sacáridos, al menos treintaicinco sacáridos o al menos cuarenta sacáridos. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, la composición también incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, la composición también incluye un adyuvante. En algunos casos que pueden combinarse con los casos anteriores, la composición también incluye un componente adicional seleccionado de: un antígeno de *Neisseria meningitidis*, un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, un antígeno de *Streptococcus pyogenes*, un antígeno de *Moraxella catarrhalis*, un antígeno de *Bordetella pertussis*, un antígeno de *Staphylococcus aureus*, un antígeno de *Staphylococcus epidermidis*, un antígeno de *Clostridium tetani*, un antígeno de *Corynebacterium diphtheriae*, un antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), un antígeno de *Pseudomonas aeruginosa*, un antígeno de *Legionella pneumophila*, un antígeno de *Streptococcus agalactiae*, un antígeno de *Neisseria gonorrhoeae*, un antígeno de *Chlamydia trachomatis*, un antígeno de *Treponema pallidum*, un antígeno de *Haemophilus ducreyi*, un antígeno de *Enterococcus faecalis*, un antígeno de *Enterococcus faecium*, un antígeno de

Helicobacter pylori, un antígeno de *Staphylococcus saprophyticus*, un antígeno de *Yersinia enterocolitica*, un antígeno de *E. coli*, un antígeno de *Bacillus anthracis*, un antígeno de *Yersinia pestis*, un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*, un antígeno de *Rickettsia*, un antígeno de *Listeria monocytogenes*, un antígeno de *Chlamydia pneumoniae*, un antígeno de *Vibrio cholerae*, un antígeno de *Salmonella typhi*, un antígeno de *Borrelia burgdorferi*, un antígeno de *Porphyromonas gingivalis*, un antígeno de *Shigella* y un antígeno de *Klebsiella*.

Otro aspecto de la divulgación incluye procedimientos para inducir una respuesta inmune que comprende la administración de la composición del aspecto inmediatamente anterior y cualquiera de sus diversos casos a un sujeto. En ciertos casos, el sujeto es humano, En algunos casos que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune reconoce el sacárido. En algunos casos que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune al sacárido es más dependiente de linfocitos T que una respuesta inmune inducida por el sacárido sin enlazar a proteínas vehículo o a otros epítomos de linfocitos T.

Otro aspecto de la divulgación incluye el uso de la composición del aspecto anterior y cualquiera de sus diversos casos para inducir una respuesta inmune potenciada al sacárido en un sujeto mamífero. En ciertos casos, el sujeto mamífero es humano. En algunos casos que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune potenciada reconoce al sacárido. En algunos casos que pueden combinarse con el caso anterior, la respuesta inmune potenciada al sacárido es más dependiente de linfocitos T que una respuesta inmune inducida por el sacárido sin enlazar a proteínas vehículo o a otros epítomos de linfocitos T.

Descripción detallada

Los polisacáridos y oligosacáridos puros son normalmente inmunógenos pobres y por lo tanto a menudo necesitan conjugarse a un péptido vehículo. Incluso cuando un polisacárido tiene suficiente inmunogenicidad, la conjugación a una proteína vehículo puede potenciar la inmunogenicidad de tal manera que necesite administrarse menos polisacárido. Adicionalmente, para la efectividad protectora en los más jóvenes, a menudo se requiere la conjugación a un péptido vehículo. El uso de la conjugación a proteínas vehículo para potenciar la inmunogenicidad de antígenos de carbohidratos es bien conocido (véase, por ejemplo, Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36, BATTERY & MOXON (2000) J R Coll Physicians Lond 34: 163-8, AHMAD & CHAPNICK (1999) Infect Dis Clin North Am 13: 113-33, vii, Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567, EP-B-0477508, Pat. de EE.UU. N.º 5.306.492, documento WO98/42721, Dick y col. en Conjugate Vaccines (ed. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, 48-1 14, Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego CA (1996), etc.); y se usa en particular para vacunas pediátricas (Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-6).

Como una alternativa a las proteínas vehículo, se ha explorado el uso de epítomos peptídicos universales, que son inmunogénicos en el contexto de la mayoría de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II [véase, por ejemplo, Alexander y col. (2000) J Immunol 164:1625-1633]. Dichos epítomos peptídicos se han identificado dentro de TT y otras proteínas. Sin embargo, el uso de epítomos únicos fue típicamente insuficiente para inducir una respuesta inmune dependiente de linfocitos T fuerte. Para abordar esto, se demostró que los péptidos vehículo poliepítomo que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T, pero que carecen de epítomos conformacionales de linfocitos B, son particularmente útiles como vehículos tanto para sacáridos individuales así como para combinaciones de sacáridos de distintos patógenos. Adicionalmente, se ha descubierto que estos péptidos vehículo poliepítomo solamente inducen como mucho una baja respuesta inmunogénica contra sí mismos incluso aunque comprendan un número de epítomos patogénicos conocidos, mientras que se habría esperado que la respuesta inmunogénica aumentaría proporcionalmente al número de epítomos patogénicos [véase, por ejemplo, la Publ. de Patente de EE.UU. 2008/0260773]. De esta manera, incluso con múltiples epítomos de linfocitos T en una disposición lineal, los péptidos vehículo poliepítomo inducen solamente una respuesta inmune contra el sacárido al que se conjugan sin inducir una respuesta inmune contra sí mismos.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que los epítomos peptídicos únicos pueden ser tan eficaces induciendo una respuesta inmune dependiente de linfocitos T contra antígenos de sacáridos cuando el antígeno de sacárido tiene al menos dos epítomos peptídicos conjugados al sacárido de tal manera que al menos un epítomo se enlace a un sacárido interno formando un conjugado no lineal.

Un aspecto de la invención por lo tanto proporciona un conjugado de sacárido que comprende un polisacárido u oligosacárido conjugado a al menos dos péptidos vehículo comprendiendo cada uno al menos un epítomo de linfocito T y opcionalmente, un adyuvante (como se define a continuación). La invención por lo tanto proporciona un conjugado de sacárido que comprende un polisacárido u oligosacárido conjugado a al menos un péptido vehículo que comprende al menos dos epítomos de linfocitos T uno de los cuales es el epítomo PV1 y opcionalmente, un adyuvante (como se define a continuación).

Los péptidos vehículo pueden conjugarse covalentemente al sacárido directamente o a través de un enlazador. Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier enlazador adecuado cuando sea necesario.

La unión del sacárido a los péptidos es preferentemente a través de un grupo -SH, preferentemente en o cerca del N o C terminal, por ejemplo, a través de la cadena o cadenas laterales de un resto o restos de cisteína. La unión puede ser alternativamente a través de un grupo -NH₂, por ejemplo, a través de la cadena o cadenas laterales de un resto o restos de lisina o un resto o restos de arginina en el péptido vehículo. Cuando el polisacárido tiene un grupo

aldehído libre, este grupo puede reaccionar con una amina en el péptido vehículo para formar un conjugado por aminación reductora. Alternativamente el polisacárido puede unirse a la proteína vehículo a través de una molécula enlazadora.

El sacárido se activará o se funcionalizará típicamente antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos cianilantes tales como CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU (véase, por ejemplo, la introducción al documento WO98/42721).

Los enlaces directos al péptido vehículo pueden comprender la oxidación del sacárido seguido de una aminación reductora con el péptido vehículo, como se describe, por ejemplo, en la Pat de EE.UU. N.º 4.761.283 y la Pat de EE.UU. N.º 4.356.170.

Los enlaces a través de un grupo enlazador pueden realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en la Pat de EE.UU. N.º 4.882.317 y la Pat de EE.UU. N.º 4.695.624. Típicamente, el enlazador se une a través de un carbono anomérico del sacárido. Un tipo de enlace preferido es un enlazador de ácido adípico, que puede formarse acoplando un grupo -NH₂ libre (por ejemplo, introducido a un polisacárido por aminación) con ácido adípico (usando, por ejemplo, activación de diimida) y después acoplado a una proteína al intermedio sacárido-ácido adípico resultante (véase, por ejemplo, el documento EP-B-0477508, Mol. Immunol, (1985) 22, 907-919 y el documento EP-A-0208375). Un tipo de enlace preferido similar es un enlazador de ácido glutárico, que puede formarse acoplado un grupo -NH libre con ácido glutárico del mismo modo. Los enlazadores de ácido adípico y glutárico también pueden formarse por acoplamiento directo al polisacárido, es decir, sin introducción previa de un grupo libre, por ejemplo un grupo -NH libre, al polisacárido, seguido del acoplamiento de una proteína al intermedio sacárido-ácido adípico/glutárico resultante. Otro tipo preferido de enlace es un enlace carbonilo, que puede formarse por la reacción de un grupo hidroxilo libre de un polisacárido modificado con CDI (Bethell G.S. y col. (1979) J Biol Chem 254, 2572-4 y Hearn M.T.W. (1981) J. Chromatogr 218, 509-18); seguido de una reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otros enlazadores incluyen β-propionamido (documento WO00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever y col. (1979) Med Microbiol Immunol 165, 171-288), haluros de haloacilo (Pat. de EE.UU. N.º 4.057.685), enlaces glucosídicos (Pat. de EE.UU. N.º 4.673.574; 4.761.283; y 4.808.700), ácido 6-aminocaproico (Pat. de EE.UU. N.º 4.459.286), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) (Pat. de EE.UU. N.º 5.204.098), dihidrazida de ácido adípico (ADH) (Pat. de EE.UU. N.º 4.965.338), restos C4 a C12 (Pat. de EE.UU. N.º 4.663.160), etc. También puede usarse la condensación de carbodiimida (documento WO2007/000343).

Puede usarse un enlazador bifuncional para proporcionar un primer grupo para acoplar a un grupo amina en el sacárido (por ejemplo, introducido al polisacárido por aminación) y un segundo grupo para acoplar al vehículo (típicamente para acoplar a una amina en el vehículo). Alternativamente, el primer grupo es capaz de acoplarse directamente al polisacárido, es decir, sin la introducción previa de un grupo, por ejemplo, un grupo amina, al polisacárido.

En algunas realizaciones, el primer grupo en el enlazador bifuncional es de esta manera capaz de reaccionar con un grupo amina (-NH₂) en el polisacárido. Esta reacción implicará típicamente una sustitución electrófila del hidrógeno de la amina. En otras realizaciones, el primer grupo en el enlazador bifuncional es capaz de reaccionar directamente con el polisacárido. En ambos conjuntos de realizaciones, el segundo grupo en el enlazador bifuncional es típicamente capaz de reaccionar con un grupo amina en el péptido vehículo. Esta reacción típicamente implicará de nuevo una sustitución electrófila de la amina.

Donde las reacciones que implican aminas tanto el polisacárido como la proteína vehículo entonces se prefiere usar un enlazador bifuncional. Por ejemplo, puede usarse un enlazador homobifuncional de fórmula X-L-X, cuando: los dos grupos X son el mismo entre sí y pueden reaccionar con aminas; y cuando L es un resto enlazante en el enlazador. De forma similar, puede usarse un enlazador heterofuncional de fórmula X-L-X, cuando: los dos grupos X son diferentes y pueden reaccionar con las aminas; y donde L es un resto enlazante en el enlazador. Un grupo X preferido es N-oxisuccinimida. L tiene preferentemente la fórmula L'-L²-L', donde L' es carbonilo. Los grupos L² preferidos son alquilos de cadena recta con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀) por ejemplo -(CH₂)₄- o -(CH₂)₃-.

Otros grupos X para su uso en los enlazadores bifuncionales descritos en el párrafo anterior son aquellos que forman ésteres cuando se combinan con HO-L-OH, tales como norborano, ácido p-nitrobenzoico y sulfo-N-hidroxisuccinimida.

Los enlazadores bifuncionales adicionales para su uso con la invención incluyen haluros de acrilóilo (por ejemplo, cloruro) y haloacilhaluros.

El enlazador se añadirá generalmente en exceso molar al polisacárido durante el acoplamiento al polisacárido.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay muchos procedimientos adecuados, por ejemplo, precipitación de sulfato amónico, cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. (véase también Lei y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264 y el documento WO00/38711). Se prefiere la ultrafiltración de flujo tangencial.

El resto de sacárido en el conjugado puede ser polisacáridos de alto peso molecular, de bajo peso molecular o de peso molecular intermedio, como se define a continuación (véase la sección de Inmunógenos de Sacárido). Se medirá típicamente el tamaño de los oligosacáridos antes de la conjugación.

El conjugado péptido vehículo-sacárido es preferentemente soluble en agua y/o en un tampón fisiológico.

5 Para algunos vehículos, la inmunogenicidad puede mejorarse si hay un espaciador entre el polisacárido y la proteína vehículo. En este contexto, un "espaciador" es un resto que es más largo que un enlace covalente único. Este espaciador puede ser un enlazador (por ejemplo, un enlazador K_MU_H), como se describe anteriormente. De forma alternativa, puede ser un resto covalentemente unido entre el polisacárido y un enlazador. Típicamente, el resto estará unido covalentemente al polisacárido antes de acoplarlo al enlazador o al vehículo. Por ejemplo, el espaciador puede ser un resto Y, en el que Y comprende un alquilo de cadena recta con 1 a 15 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅), típicamente de 6 a 12 átomos de carbono (por ejemplo, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). Los presentes inventores han descubierto que un alquilo de cadena recta con 10 átomos de carbono (es decir, -(CH₂)₁₀) es particularmente adecuado y puede proporcionar mayor inmunogenicidad que las cadenas más cortas (por ejemplo, -(CH₂)₂). Típicamente, Y se une al carbono anomérico del polisacárido, habitualmente a través de un enlace -O-. Sin embargo, Y puede unirse a las otras partes del polisacárido y/o a través de otros enlaces. El otro extremo de Y se une al enlazador por cualquier enlace adecuado. Típicamente, Y termina con un grupo amina para facilitar el enlace a un enlazador bifuncional como se describe anteriormente. En estas realizaciones, Y se une de esta manera al enlazador por un enlace -NH-. En consecuencia, se prevé específicamente un conjugado con la siguiente estructura para su uso en la presente invención: en el que n+2 está en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 2-40. Preferentemente, n+2 está en el intervalo de 25-30 u 11-19, por ejemplo, 13-17. Los presentes inventores han descubierto que n+2 = 15 es adecuado. Y es como se describe anteriormente.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para fabricar un conjugado de sacárido conjugado a un péptido o péptidos vehículo, en el que la etapa de conjugación se lleva a cabo en un tampón fosfato con fosfato >10 mM; y a un conjugado obtenido por este procedimiento. Los presentes inventores han descubierto que el fosfato sódico es una forma adecuada de fosfato para el tampón. El pH del tampón puede ajustarse a entre 7,0-7,5, particularmente 7,2. La etapa de conjugación se lleva a cabo típicamente en un tampón fosfato con fosfato entre 20-200 mM, por ejemplo, 50-150 mM. En particular, los presentes inventores han descubierto que es adecuado un tampón fosfato con fosfato 90-110 mM, por ejemplo, aproximadamente 100 mM. La etapa de conjugación se lleva a cabo habitualmente a temperatura ambiente. De forma similar, la etapa de conjugación se lleva a cabo habitualmente a presión ambiente. Típicamente, el sacárido se une a un enlazador como se describe anteriormente antes de la etapa de conjugación. En particular, el sacárido puede unirse a uno o más enlazadores bifuncionales como se describe anteriormente. El extremo libre del enlazador o enlazadores puede comprender un grupo para facilitar la conjugación al péptido o péptidos vehículo. Por ejemplo, los presentes inventores han descubierto que el extremo libre del enlazador puede comprender un grupo éster, por ejemplo, un grupo éster de N-hidroxisuccinimida.

Los conjugados de sacárido desvelados en el presente documento pueden incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los conjugados de sacárido desvelados en el presente documento pueden incluir además un adyuvante. El adyuvante puede comprender uno o más de los adyuvantes descritos a continuación.

40 Los conjugados de sacárido pueden usarse también en procedimientos para elevar una respuesta inmune en un mamífero (o un ave), que comprenden además administrar al mamífero (o ave) una composición de la invención.

Inmunógenos de sacárido

Cualquier polisacárido u oligosacárido capaz de inducir una respuesta inmune en un mamífero o un ave puede usarse en los conjugados de sacáridos no lineales y en los conjugados de sacáridos lineales como se desvela en el presente documento (es decir, un inmunógeno de sacárido). Preferentemente, el sacárido es capaz de inducir una respuesta inmune contra un patógeno de interés. El sacárido puede ser ramificado o lineal.

Pueden usarse sacáridos de bajo peso molecular, particularmente aquellos con un peso molecular de menos de 100 kDa (por ejemplo, menos de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 o 15 kDa). También es posible usar oligosacáridos que contengan, por ejemplo, 60 o menos (por ejemplo, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, o 4) unidades de monosacárido. Dentro de este intervalo, se prefieren los oligosacáridos con entre 10 y 50 o entre 20 y 40 unidades de monosacárido.

Pueden usarse polisacáridos de alto peso molecular o incluso nativos, particularmente aquellos con un peso molecular mayor de 50 kDa (por ejemplo, mayor de 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 270, 300, 350, o 400 kDa). También es posible usar sacáridos que contengan, por ejemplo, 20 o más (por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100) unidades de monosacárido. Dentro de este intervalo, se prefieren los sacáridos con más de cincuenta o incluso más de cien unidades de monosacárido.

Los inmunógenos de sacárido ejemplares se detallan a continuación.

Preferentemente, el inmunógeno de sacárido en los conjugados en una composición de la invención es un sacárido bacteriano y en particular un sacárido capsular bacteriano.

5 Los ejemplos de sacáridos capsulares bacterianos que pueden incluirse en las composiciones de la invención incluyen sacáridos capsulares 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, particularmente 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y/o 23F), *Streptococcus agalactiae* (tipos 1a, 1b, II, III, IV, V, VI, VII y/o VIII, tales como los antígenos de sacárido desvelados en las referencias 20-23), *Haemophilus influenzae* (cepas tipificables: a, b, c, d, e y/o f), *Pseudomonas aeruginosa* (por ejemplo LPS aislado de PA01, serotipo O5),
 10 *Staphylococcus aureus* (de, por ejemplo, los serotipos 5 y 8), *Enterococcus faecalis* o *E. faecium* (repeticiones de trisacáridos), *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella spp.*, etc. Otros sacáridos que pueden incluirse en las composiciones de la invención incluyen glucanos (por ejemplo, glucanos fúngicos, tales como aquellos de *Candida albicans*) y sacáridos capsulares fúngicos por ejemplo de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*.

15 ***N. meningitidis***: En ciertas realizaciones, las composiciones de conjugado pueden incluir sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*. En otras realizaciones, dichas composiciones comprenden además un antígeno de uno o más de los siguientes: (a) *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* tipo B; *Staphylococcus aureus*, estreptococos de los grupos A y B, *E. coli* patógena y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*.

20 La cápsula del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA) natural es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato enlazada ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La cápsula del serogrupo B de *N. meningitidis* (MenB) es un homopolímero de ácido siálico enlazado ($\alpha 2 \rightarrow 8$). El sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC) es un homopolímero de ácido siálico enlazado ($\alpha 2 \rightarrow 9$), con O-acetilación variable en las posiciones 7 y/u 8. El sacárido del serogrupo W135 de *N. meningitidis* es un polímero que tiene unidades de
 25 disacárido ácido siálico-galactosa [$\rightarrow 4$]-D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$). Tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico. El sacárido del serogrupo Y de *N. meningitidis* es similar al sacárido del serogrupo w135, excepto por que la unidad de repetición del disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa [$\rightarrow 4$]-D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$). También tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico.

30 En ciertas realizaciones las composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones las composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones las composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* tipo B y los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones las composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* tipo B y los
 35 serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones las composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* y los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones las composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* y los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones las composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* tipo B, *S. pneumoniae* y los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En ciertas realizaciones las
 40 composiciones de conjugado incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* tipo B, *S. pneumoniae* y los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.

Streptococcus pneumoniae: Los conjugados de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* pueden incluir un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y opcionalmente una o más proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacárido pueden seleccionarse de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, HA, 12F, 14,
 45 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Los antígenos proteicos opcionales pueden seleccionarse de una proteína identificada en el documento WO98/18931, el documento WO98/18930, la Pat. de EE.UU. N.º 6.699.703, la Pat. de EE.UU. N.º 6.800.744, el documento WO97/43303 y el documento WO97/37026. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* pueden seleccionarse de la familia de la Tríada de Poli Histidina (PhtX), la familia de la Proteína de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, la familia LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncado de CbpX-truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Spl28, SplOI, Spl30, Spl25 o Spl33.
 50 ***Staphylococcus aureus***: Los conjugados de sacárido de *Staphylococcus aureus* pueden incluir los sacáridos capsulares de *S. aureus* 5, 8 y 336 y fragmentos de los mismos y opcionalmente antígenos de proteínas derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, quinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben el englobamiento fagocítico (cápsula, Proteína A), carotenoides, producción de catalasa, Proteína A, coagulasa, factor de aglutinamiento y/o toxinas de daño de membrana (opcionalmente detoxificadas) que lisan las membranas de las
 55 células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina). Algunos procedimientos de despolimerización ejemplares para generar fragmentos de sacáridos capsulares de *S. aureus* pueden encontrarse en N.º de Ser. De EE.UU. 61/247.518, titulado "Conjugation of Staphylococcus Aureus Type 5 and Type 8 Capsular Polysaccharides," enviado el 30 de septiembre de 2009, de la página 5, línea 6 a la página 6, línea 23, que se hace referencia de esta manera para su enseñanza de dichas técnicas de despolimerización. ***Haemophilus influenzae B (Hib)***: los conjugados de
 60 sacárido Hib pueden incluir antígenos de sacárido Hib. ***Streptococcus agalactiae* (Estreptococos de grupo B)**:

Los conjugados de sacárido de *Streptococos* del grupo B pueden incluir antígenos de sacárido derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII como se identifica en el documento WO04/041157 y opcionalmente uno o más antígenos de proteínas incluyendo, sin limitación como se identifica en los documentos WO02/34771, WO03/093306, WO04/041157 o WO05/002619 (incluyendo a modo de ejemplo las proteínas GBS 80, GBS 104, GBS 276 y GBS 322).

Vibrio cholerae: Los conjugados de sacárido de *V. cholerae* pueden incluir LPS, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O-específicos de O1 Inaba.

Salmonella typhi (fiebre tifoidea): Los conjugados de sacárido pueden incluir polisacáridos capsulares tales como Vi.

Sacáridos de glucano: Los sacáridos para los conjugados incluyen glucanos. Los glucanos son polisacáridos que contienen glucosa encontrados, entre otros patógenos, en las paredes de células fúngicas. Los β -glucanos incluyen uno o más enlaces α entre las subunidades de glucosa, mientras que los β -glucanos incluyen uno o más enlaces β entre las subunidades de glucosa. El glucano usado de acuerdo con la invención incluye enlaces β y puede contener solamente enlaces β (es decir, ningún enlace α).

El glucano puede comprender uno o más enlaces β -1,3 y/o uno o más enlaces β -1,6. También puede comprender uno o más enlaces β -1,2 y/o enlaces β -1,4, pero normalmente sus únicos enlaces β serán enlaces β -1,3 y/o enlaces β -1,6.

El glucano puede ser ramificado o lineal.

Los β -glucanos nativos de longitud completa son insolubles y tienen un peso molecular en el intervalo de mega Dalton. Se prefiere usar glucanos solubles en las composiciones inmunogénicas de la invención. La solubilización puede lograrse fragmentando glucanos insolubles largos. Esto puede lograrse por hidrólisis o, más convenientemente, por digestión con una glucanasa (por ejemplo, con una β -1,3-glucanasa o una β -1,6-glucanasa). Como una alternativa, pueden prepararse sintéticamente glucanos cortos uniendo bloques de construcción de monosacáridos.

Pueden usarse glucanos de bajo peso molecular, particularmente aquellos con un peso molecular de menos de 100 kDa (por ejemplo, menos de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 o 15 kDa). También es posible usar oligosacáridos que contienen, por ejemplo, 60 o menos (por ejemplo, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, o 4) unidades de monosacárido de glucosa. Dentro de este intervalo, se prefieren los oligosacáridos con entre 10 y 50 o entre 20 y 40 unidades de monosacárido.

Pueden usarse incluso glucanos de alto peso molecular, particularmente aquellos con un peso molecular de más de 50 kDa (por ejemplo, más de 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 270, 300, 350 o 400 kDa). También es posible usar sacáridos que contengan, por ejemplo, 20 o más (por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100) unidades de monosacárido. Dentro de este intervalo, se prefieren los sacáridos con más de 50 o más de 100 unidades de monosacárido.

El glucano puede ser un glucano fúngico. Un "glucano fúngico" se obtendrá generalmente de un hongo pero, cuando una estructura de glucano particular se encuentra tanto en hongos como en organismos distintos de hongos (por ejemplo, en bacterias, plantas inferiores o algas) entonces el organismo no fúngico puede usarse como una fuente alternativa. De esta manera el glucano puede derivar de la pared celular de una *Candida*, tal como *C. albicans*, o de *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Pythium insidiosum*. Las fuentes ejemplares de β -glucanos fúngicos pueden encontrarse en el documento WO2009/077854.

En algunas realizaciones, el glucano es un glucano β -1,3 con alguna ramificación β -1,6, como se ve, por ejemplo, en las laminarinas. Las laminarinas se encuentran en algas pardas y algas marinas. Las relaciones β (1-3): β (1-6) de las laminarinas varían entre diferentes fuentes, por ejemplo, la relación es tan baja como 3:2 en la laminarina de *Eisenia bicyclis*, pero tan alta como 7:1 en la laminarina de *Laminaria digitata* (Pang y col. (2005) Biosci Biotechnol Biochem 69:553-8). De esta manera, el glucano usado con la invención puede tener una relación β (1-3): β (1-6) de entre 1,5:1 y 7,5:1 (por ejemplo, aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 o 7:1). Opcionalmente, el glucano puede tener una subunidad de manitol terminal, por ejemplo, un resto de manitol unido en 1,1- α (Read y col. (1996) Carbohydr Res. 281:187-201). El glucano puede comprender también subunidades de manosa.

En otras realizaciones, el glucano tiene exclusiva o principalmente enlaces β -1,3, como se ve en el curdlano. Los presentes inventores han descubierto que estos glucanos pueden ser más inmunogénicos que los glucanos que comprenden otros enlaces, particularmente glucanos que comprenden enlaces β -1,3 y una mayor proporción de enlaces β -1,6. De esta manera el glucano puede estar hecho solamente de restos de glucosa unidos en β -1,3 (por ejemplo, β -D-glucopiranosas exclusivamente con enlaces 1,3). Aunque opcionalmente, el glucano puede incluir restos de monosacáridos que no son restos de glucosa unidos en β -1,3, por ejemplo, puede incluir restos de glucosa unidos en β -1,6. La relación de restos de glucosa unidos en β -1,3 a estos restos distintos debe ser al menos 8:1 (por ejemplo, >9:1, >10:1, >11:1, >12:1, >13:1, >14:1, >15:1, >16:1, >17:1, >18:1, >19:1, >20:1, >25:1, >30:1, >35:1, >40:1, >45:1, >50:1, >75:1, >100:1, etc.) y/o hay una o más (por ejemplo >1, >2, >3, >4, >5, >6, >7, >8, >9, >10, >11, >12, etc.) secuencias de al menos cinco (por ejemplo >5, >6, >7, >8, >9, >10, >11, >12, >13, >14, >15, >16, >17,

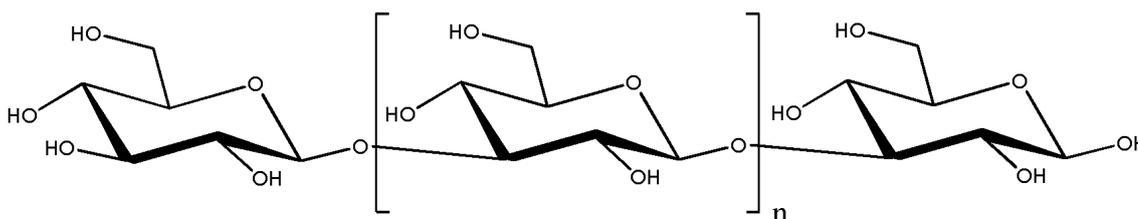
>18, >19, >20, >30, >40, >50, >60, etc.) restos adyacentes no terminales unidos a otros restos solamente por enlaces β -1,3. Por "no terminal" se entiende que el resto no está presente en un extremo libre del glucano. En algunas realizaciones, los restos no terminales adyacentes pueden no incluir ningún resto conjugado a una molécula vehículo, enlazador u otro espaciador como se describe a continuación. Se ha descubierto que la presencia de cinco restos adyacentes no terminales enlazados a otros restos solamente por enlaces β -1,3 puede proporcionar una respuesta protectora de anticuerpos, por ejemplo, contra *C. albicans*.

En realizaciones adicionales, una composición puede incluir dos glucanos diferentes, por ejemplo, un primer glucano teniendo una relación β (1-3): β (1-6) de entre 1,5:1 y 7,5:1 y un segundo glucano teniendo exclusiva o principalmente enlaces β -1,3. Por ejemplo, una composición puede incluir tanto un glucano de laminarina como un glucano de curdlano.

Los procedimientos ejemplares de preparación de β -glucanos pueden encontrarse en el documento WO2009/077854.

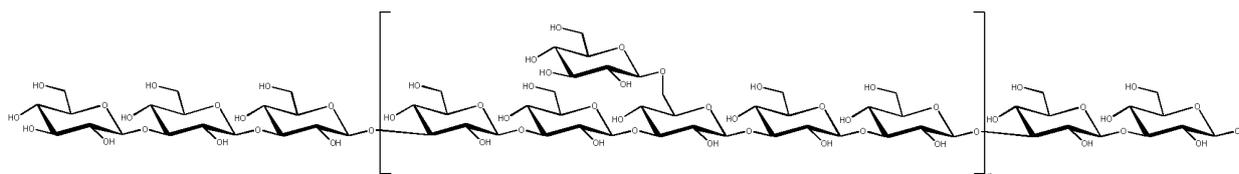
La laminarina y el curdlano se encuentran típicamente en la naturaleza como polímeros de alto peso molecular por ejemplo con un peso molecular de al menos 100 kDa. A menudo son insoluble en medios acuosos. En sus formas naturales, por lo tanto, no son bien adecuados para la inmunización. La policonjugación no lineal con más péptidos hidrófilos puede superar este problema de solubilidad haciendo a los polímeros de alto peso molecular adecuados para la inmunización como conjugados. En particular, los glucanos con las siguientes estructuras (A) o (B) se prevén específicamente para su uso en la presente invención:

(A)



en la que $n+2$ está en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 2-40. Preferentemente, $n+2$ está en el intervalo de 25-30 u 11-19, por ejemplo, 13-17. Los presentes inventores han descubierto que $n+2 = 15$ es adecuado.

(B)



en la que n está en el intervalo de 0-9, por ejemplo, entre 1-7 o entre 2-6. Preferentemente, n está en el intervalo de 3-4 o 1-3. Los presentes inventores han descubierto que $n = 2$ es adecuado.

El glucano (como se define anteriormente) es preferentemente una especie molecular única. En esta realización, todas las moléculas de glucano son idénticas en términos de secuencia. En consecuencia, todas las moléculas de glucano son idénticas en términos de sus propiedades estructurales, incluyendo peso molecular, etc. Típicamente, esta forma de glucano se obtiene por síntesis química, por ejemplo, usando los procedimientos descritos anteriormente. Por ejemplo, Jamois y col. (2005) *Glycobiology* 15(4):393-407, describe la síntesis de una especie única unida en β -1,3. Alternativamente, en otras realizaciones, el glucano puede obtenerse a partir de un glucano natural, por ejemplo, un glucano de *L. digitata*, *Agrobacterium* o *Euglena* como se describe anteriormente, purificándose el glucano hasta que se obtiene la especie molecular única requerida. Los glucanos naturales que se han purificado de esta manera están disponibles en el mercado. Un glucano que es una especie molecular única puede identificarse midiendo la polidispersidad (M_w/M_n) de la muestra de glucano. Este parámetro puede medirse adecuadamente por SEC-MALLS, por ejemplo como se describe en Bardotti y col. (2008) *Vaccine* 26:2284-96. Los glucanos adecuados para su uso en esta realización de la invención tienen una polidispersidad de aproximadamente 1, por ejemplo, 1,01 o menos.

La solubilidad de los glucanos naturales, tales como curdlano, puede aumentarse introduciendo grupos iónicos (por ejemplo, por sulfatación, particularmente en O-6 en el curdlano). Dichas modificaciones pueden usarse con la invención, pero idealmente se evitan ya que pueden alterar la antigenicidad del glucano.

5 Cuando los glucanos se aíslan de fuentes naturales, pueden aislarse en combinación con contaminantes. Por ejemplo, los presentes inventores han descubierto que los glucanos pueden contaminarse con florotanino, que es identificable por espectroscopía ultravioleta-visible (UV/VIS). Este problema es particularmente común cuando el glucano se aísla de un alga parda o un alga de mar. Por ejemplo, el espectro UV de una laminarina disponible en el mercado extraída de *Laminaria digitata* incluye un pico de absorción que resulta de la presencia de contaminación con florotanino. De forma similar, los glucanos extraídos de *Artie laminarialis*, *Saccorhiza dermatodea* y *Alaria esculenta* tienen espectros UV que incluyen un pico de absorción que resulta de la contaminación de florotáninos.

10 La presencia de florotáninos en una muestra de glucano puede afectar a las propiedades biológicas del glucano. En consecuencia, puede ser deseable retirar el florotanino de la muestra, especialmente cuando el glucano es para uso médico en numerosos aspectos de la presente invención. Los procedimientos ejemplares para retirar florotáninos de los β -glucanos puede encontrarse en el documento WO2009/077854.

Péptidos vehículo

15 Como se analiza anteriormente, los polisacáridos son típicamente antígenos T-independientes débiles. Esta inmunogenicidad puede aumentarse en cantidad y calidad por conjugación a los vehículos proteicos, que desplazan la respuesta inmune a una respuesta más dependiente de linfocitos T. Como se muestra en la Figura 1, el modelo actual es que los conjugados se procesan dentro de las células presentadoras de antígenos y los rompen en péptidos o glucopéptidos que se presentan por las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II; una interacción adicional con linfocitos T específicos de vehículo induce después la diferenciación de linfocitos B específicos de polisacárido que proporcionan el estímulo para la producción de anticuerpos y la memoria.

20 Como una consecuencia, una vacuna conjugada induce una respuesta dependiente de linfocitos T (TD) ya muy temprana en la vida que da lugar a la memoria inmunológica y potencia la respuesta por dosis adicionales de la vacuna [Constantino, P. y col. Expert Opin. Drug Discov. 2011, 6(10), 105-1066]. En la búsqueda de vehículos alternativos, otros han reemplazado proteínas vehículo por péptidos sintéticos que contiene epítomos de linfocitos T CD4+ seleccionados [Falugi, F. y col. Eur. J. Immunol, 2001, 31, 3816-3824]. En las referencias bibliográficas algunos artículos informaron de la preparación de glucopéptidos donde la proteína vehículo entera se había sustituido por péptidos de epítomos de linfocitos T induciendo una respuesta inmune comparable o mayor con respecto a una vacuna de glucoconjugado convencional. Con respecto al desarrollo de vacunas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), se han conjugado fragmentos sintéticos del polisacárido capsular, poli-3- β -D-ribosa(1,1)-D-ribitol-5-fosfato (sPRP) a péptidos sintéticos derivados de las proteínas P1, P2 y P6 de la membrana externa de Hib.

30 Estos glucopéptidos sintéticos fueron inmunogénicos, provocando respuestas de anticuerpos anti-PRP y además indujeron niveles protectores de anticuerpo anti-PRP [Kandil, A.A. y col. Glycoconjugate Journal, 1997, 14, 13-17]. Para la vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* tipo 17F, para sustituir la proteína vehículo, algunos péptidos se seleccionaron según la base de sus propiedades demostradas o predichas estimulantes de linfocitos Th: HSP, un epítomo Th dominante de hsp65 micobacteriano; HAG, de la hemaglutinina del virus de la gripe; Neumolisina (o sus toxoides). Como antígeno de sacárido, se ha seleccionado el polisacárido neumocócico tipo 17F (PS) y los glucopéptidos resultantes han provocado consistentemente respuestas de IgM e IgG anti-PS en ratones [De Velasco, E.A. y col. Infection and Immunity, 1995, 63, 961-968]. Como se muestra en la Figura 2, Avcil y col. propusieron un nuevo modelo de trabajo para la vacuna de glucoconjugado, donde el procesamiento de tanto la porción de proteína como la de carbohidrato de los glucoconjugados generaron glucano_p-péptidos. La unión al MHCII de la porción peptídica del glucano_p-péptido permitió la presentación por el MHCII del carbohidrato más hidrófilo al receptor $\alpha\beta$ de los linfocitos T CD4+ ($\alpha\beta$ TCR). El receptor $\alpha\beta$ de los linfocitos T CD4+ ayudantes reconocieron y respondieron a los epítomos de glucano_p presentados en el contexto del MHCII. La activación del linfocito T por el carbohidrato-MHCII, junto con la co-estimulación, dio como resultado la producción de citocinas en los linfocitos T tales como IL-4 e IL-2, que a su vez indujeron la maduración del linfocito B cognado para volverse un linfocito B de memoria, con la posterior producción de anticuerpos IgG específicos de carbohidrato como se informa en la imagen a continuación. En resumen, siguiendo este modelo de trabajo, los linfocitos T podrían reorganizar los polisacáridos y posiblemente otras estructuras si se unen covalentemente a un anclaje peptídico, como se demuestra por el reconocimiento de clones de linfocitos T de un epítomo de carbohidrato puro independientemente del péptido al que se unen en un conjugado prototípico GBS tipo III-TT. De esta manera, hay una cantidad justa de referencias bibliográficas disponible para guiar al experto en la materia en la selección de epítomos de linfocitos T para su uso en los conjugados desvelados en el presente documento.

55 Los péptidos vehículo pueden comprender uno o más epítomos de linfocitos T (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más). Para los conjugados, el péptido vehículo tiene preferentemente seis o menos epítomos de linfocitos T, cinco o menos epítomos de linfocitos T, cuatro o menos epítomos de linfocitos T, tres o menos epítomos de linfocitos T, seis o menos epítomos de linfocitos T o solamente un epítomo de linfocito T. Para los péptidos vehículo poliepítomo, el péptido vehículo comprende preferentemente 6 o más epítomos de linfocitos T o 10 o más epítomos de linfocitos T, donde al menos un epítomo es el epítomo PV1. Más preferentemente el péptido vehículo poliepítomo comprende diecinueve o más epítomos de linfocitos T, donde al menos un epítomo es el epítomo PV1. El péptido vehículo comprende preferentemente al menos un epítomo PV1 de linfocito T, al menos dos epítomos PV1 de linfocitos T, al menos tres epítomos PV1 de linfocitos T, al menos cuatro epítomos PV1 de linfocitos T, al menos cinco epítomos PV1 de linfocitos T, al menos un epítomo PV1 de linfocito T o todos los epítomos de linfocitos T pueden ser epítomos PV1 de linfocitos T. Cada péptido vehículo puede tener solamente una copia de un epítomo particular o

5 puede tener más de una copia de un epítipo particular. Los epítipos son epítipos de linfocitos T CD4⁺. Preferentemente el péptido vehículo poliepítipo comprende al menos un epítipo bacteriano además del epítipo vírico PV1. Preferentemente los epítipos derivan de antígenos a los que la población humana está expuesta frecuentemente bien por infección natural o vacunación, por ejemplo, los epítipos pueden derivar del virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus del sarampión, virus de la gripe, virus de la varicela zóster, virus de la polio, proteínas de choque térmico de cepas de *Mycobacterium bovis* y *M. leprae* y/o *Streptococcus* etc. Preferentemente los epítipos se seleccionan de la toxina tetánica (TT), CSP de *Plasmodium falciparum* (PfC), cápside nuclear del virus de la hepatitis B (VHBnc), hemaglutinina (HA) de la gripe, antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y la matriz de la gripe (MT). Los epítipos usados en los péptidos vehículo se seleccionan preferentemente de la siguiente tabla

10 1. Lo más preferentemente el epítipo es el epítipo PV1.

Nombre del péptido	Fuente	Secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO]
P32TT	Toxina tetánica	LKFIKRYTPNNEIDS- [1]
P30TT	Toxina tetánica	FNNFTVSWFLRVPK/SAHLE- [2]
Hpw	<i>Candida albicans</i>	QGETEEALIQRSY- [3]
Eno1	<i>Candida albicans</i>	DSRGNPTVEVDFTT- [4]
Gap1	<i>Candida albicans</i>	NRSPSTGEQKSSGI- [5]
Fba	<i>Candida albicans</i>	YGKDVKDLFDYAQE- [6]
Met6	<i>Candida albicans</i>	PRIGGQRELKITE- [7]
P2TT	Toxina tetánica	QYIKANSKFIGITE [8]
PV1	Virus de la polio	KLFAVWKITYKDT [9]
P23TT	Toxina tetánica	VSIDKFRIFCKANPK [10]
P32TT	Toxina tetánica	LKFIKRYTPNNEIDS [11]
P21TT	Toxina tetánica	IREDNITLKLDRCNN [12]
PfC	<i>P. falciparum</i>	EKKIAKMEKASSVFNVVN [13]
HBVnc	Hepatitis B	PHHTALRQAILCWGELMTLA [14]
HA	Virus de la gripe	PKYVKQNTLKLAT [15]
HBsAg	Hepatitis B virus	FFLLTRILTIPQSLD [16]
MT	Virus de la gripe (proteína matriz)	YSGPLKAEIAQRLEDV [17]
OvaP	Ovoalbúmina	ISQAVHAAHAEINEAGR [18]

Cualquiera de las secuencias de epítipos puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o más) alteraciones de aminoácidos únicos (deleciones, inserciones, sustituciones), que pueden ser en localizaciones separadas o pueden estar contiguas, en comparación con las SEQ ID NO 1-18.

15 Los epítipos de linfocitos T se conocen bien y los fragmentos peptídicos antigénicos caracterizados derivados típicamente de un patógeno que, cuando se presentan por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), interactúan con los receptores de linfocitos T después del transporte a la superficie de una célula presentadora de antígenos. Se han usado datos de afinidad determinados experimentalmente para desarrollar una diversidad de algoritmos de predicción de la unión al MHC, que pueden distinguir aglutinantes de no aglutinantes basándose en la secuencia peptídica [Davies, m.N.; Flower, D.R. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines Drug Discovery Today, 2007, 12 (9/10), 389-395;]. Estos algoritmos pueden usarse para seleccionar epítipos de linfocitos T adicionales para su uso en los conjugados desvelados en el presente documento.

20 Cuando hay múltiples epítipos en un péptido vehículo, los epítipos se unen preferentemente por espaciadores. Preferentemente el espaciador es una secuencia de aminoácidos corta (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) que no es un epítipo. Un espaciador preferido comprende uno o más restos de glicina, por ejemplo, -KG-. Preferentemente los péptidos vehículo más largos comprenden una región N o C terminal que comprende una cola de seis His, una etiqueta de inmunoafinidad útil para detectar o purificar el péptido vehículo (por ejemplo puede usarse la secuencia "MDYKDDDD" [SEQ ID NO: 18] y/o una secuencia de escisión de proteasa. Preferentemente la secuencia proteolítica es el sitio de reconocimiento del factor Xa.

30 Preferentemente el péptido vehículo no comprende epítipos de linfocitos T supresores.

Además de los epítipos de linfocitos T, los péptidos vehículo pueden comprender otros péptidos o fragmentos proteicos, tales como epítipos de citocinas inmunomoduladoras tales como interleucina 2 (IL-2) o el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

Los péptidos vehículo usados con la invención pueden prepararse por diversos medios (por ejemplo expresión recombinante, purificación a partir de cultivo celular, síntesis química, etc.). Se prefieren los péptidos químicamente sintetizados, especialmente cuando el péptido vehículo solo tiene uno o pocos epítopos.

5 Los péptidos vehículo usados con la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir, sustancialmente libres de otros péptidos y son generalmente al menos aproximadamente un 50 % puros (en peso) y habitualmente al menos aproximadamente un 90 % puros, es decir, menos de aproximadamente el 50 % y más preferentemente menos de aproximadamente el 10 % (por ejemplo, el 5 %) de una composición está formada por otros péptidos expresados. Para evitar dudas, cuando un péptido vehículo purificado o sustancialmente purificado se conjuga a un sacárido se usa como un componente de una vacuna, el péptido vehículo todavía está "purificado" o "sustancialmente purificado" a pesar de la presencia de otros antígenos proteicos y componentes celulares (por ejemplo, otros polisacáridos, vesículas de membrana externa, etc.).

10 El término "péptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede interrumpirse por sustancias distintas de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tales como la conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen, por ejemplo, péptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los péptidos pueden aparecer como cadenas únicas o cadenas asociadas.

15 La comparación de la respuesta inmune elevada en un sujeto por el conjugado con la respuesta inmune elevada por el sacárido junto puede llevarse a cabo por cualquier medio disponible para un experto en la materia. Un procedimiento sencillo como se usa en los ejemplos a continuación implica la inmunización de un sujeto modelo tal como un ratón y después un desafío con una dosis letal del patógeno de interés. Para muchas composiciones tales como los conjugados meningocócicos, la inmunización de un ratón y después la demostración de que los sueros de ratón comprenden anticuerpos bactericidas es típicamente suficiente para demostrar que la composición puede inducir una respuesta inmune protectora. Para una comparación apropiada, un experto en la materia seleccionaría de forma natural el mismo adyuvante que un adyuvante de aluminio.

20 La invención proporciona un procedimiento para producir un péptido vehículo de la invención, que comprende la etapa de sintetizar al menos parte del péptido por medios químicos.

25 La invención también proporciona un procedimiento para producir un péptido de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora transformada con un ácido nucleico de la invención en condiciones que inducen la expresión peptídica. El péptido puede purificarse después, por ejemplo, a partir de sobrenadantes del cultivo.

30 Aunque la expresión de los péptidos vehículo de la invención puede tener lugar en un hospedador homólogo, la invención usará habitualmente un hospedador heterólogo para la expresión. El hospedador heterólogo puede ser procariota (por ejemplo, una bacteria) o eucariota. Los hospedadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levaduras, etc.

Composiciones inmunogénicas y medicamentos

35 Los conjugados de sacárido de la invención son útiles como principios activos (inmunógenos) en composiciones inmunogénicas y dichas composiciones pueden ser útiles como vacunas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser bien profilácticas (es decir, previenen la infección) o terapéuticas (es decir tratan la infección), pero típicamente serán profilácticas.

40 Las composiciones inmunogénicas serán farmacéuticamente aceptables. Normalmente incluirán componentes además de los antígenos por ejemplo típicamente incluyen uno o más vehículo o vehículos, excipiente o excipientes y/o adyuvante o adyuvantes farmacéuticos. Un análisis exhaustivo de los vehículos y excipientes está disponible en la ref. 96. Los análisis exhaustivos de los adyuvantes de vacunas están disponibles en las ref. 1 y 2.

45 Las composiciones se administrarán generalmente a un mamífero en forma acuosa. Antes de la administración, sin embargo, la composición puede estar en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunas vacunas se fabrican en forma acuosa, después se cargan y distribuyen y administran también en forma acuosa, otras vacunas se liofilizan durante la fabricación y se reconstituyen en forma acuosa en el momento del uso. De esta manera puede secarse una composición de la invención, tal como una formulación liofilizada.

50 La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna esté sustancialmente libre (es decir, menos de 5 µg/ml) de material de mercurio por ejemplo libre de tiomersal. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas. Las vacunas libres de conservantes son particularmente preferidas.

Para mejorar la estabilidad térmica, una composición puede incluir un agente protector de temperatura.

Para controlar la toxicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml por ejemplo aproximadamente 10 ± 2 mg/ml de NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrógeno fosfato potásico, deshidrato de fosfato disódico, cloruro magnésico, cloruro cálcico, etc.

Las composiciones tendrán generalmente una osmolaridad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg y caerá más preferentemente dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones estarán incluidos típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1 y más típicamente entre 6,0 y 8,0 por ejemplo 6,5 y 7,5 o entre 7,0 y 7,8.

La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirógena por ejemplo que contiene <1 EU (unidad de endotoxina, por sus siglas en inglés, una medida convencional) por dosis y preferentemente <0,1 EU por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.

La composición puede incluir material para una inmunización única o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit "multidosis"). La inclusión de un conservante se prefiere en disposiciones multidosis. Como una alternativa (o además) a incluir un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden envasarse en un recipiente que tenga un adaptador aséptico para la retirada de material.

Las vacunas humanas se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a los niños.

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender uno o más agentes inmunoreguladores. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunoreguladores incluyen uno o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2, analizados adicionalmente a continuación.

Los adyuvantes que pueden usarse en composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato cálcico (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la ref. 3). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., tomando las sales cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalinas, amorfas, etc.). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen minerales pueden formularse también como una partícula de sal metálica (4).

Pueden usarse los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan solamente por conveniencia, ya que no es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 1). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que habitualmente son al menos parcialmente cristalinos. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo contienen también una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Pueden obtenerse por precipitación y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo en la sal.

Una morfología fibrosa (por ejemplo como se ve en las micrografías electrónicas de transferencia) es típica para los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es de forma típica aproximadamente 11 es decir el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han indicado capacidades adsorptivas de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes de fosfato de aluminio generalmente tienen una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2 y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, en particular para las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+} /ml. El fosfato de aluminio estará generalmente particulado (por ejemplo, una morfología tipo placa como se ve en las micrografías electrónicas de transferencia). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han indicado capacidades adsorptivas de entre 0,7-1,5 mg de

proteína por mg Al⁺⁺⁺ a pH 7,4 para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio se relaciona inversamente con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de los reactivos usados para la preparación de la sal por precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán generalmente un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5 por ejemplo aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo un tampón fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuosos libres por ejemplo presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM y más preferentemente de aproximadamente 10 mM. Las suspensiones pueden comprender también cloruro sódico.

La invención puede usar una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como un fosfato de aluminio. En este caso puede haber más fosfato que hidróxido de aluminio, 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 la administración a un paciente es preferentemente menos 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.

B. Emulsiones oleaginosas

Las composiciones de emulsiones oleaginosas adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59(TM) (Capítulo 10 de la ref. 1; véase también la ref. 5) (5 % de escualeno, 0,5 % de TWEEN 80(TM) y 0,5 % de SPAN 85(TM), formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). También pueden usarse el adyuvante completo de Freund (CFA, por sus siglas en inglés) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA, por sus siglas en inglés).

Se conocen diversas emulsiones de aceite en agua y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite o aceites y el tensioactivo o tensioactivos biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión tienen generalmente menos de 5 μm de diámetro e idealmente tienen un diámetro sub-micrométrico, lográndose estos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotitas con un tamaño de menos de 220 nm ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

La emulsión puede comprender aceites tales como aquellos de una fuente animal (tal como de pescado) o vegetal. Las fuentes para los aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nueces. Puede usarse el aceite de jojoba, por ejemplo obtenido de la judía de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de girasol, aceite de semillas de algodón, aceite de semillas de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos cereales tales como trigo, cebada, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Algunos ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, que no son de origen natural en los aceites de semillas, pueden prepararse por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados empezando a partir de los aceites de nueces y de semillas. Las grasas y los aceites de la leche de mamíferos son metabolizables y pueden usarse por lo tanto en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena tales como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden usarse en el presente documento. Un número de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado insaturado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano, que se prefiere particularmente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse por procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase a continuación). Pueden usarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo, por sus siglas en inglés). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15 y más preferentemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán (comúnmente denominados los Tweens), especialmente el polisorbato 20 y el polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de

- butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros en bloque EO/PO lineales; octoxinolos, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) de repetición, siendo octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilados de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como los SPAN), tales como trioleato de sorbitán (SPAN 85(TM)) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son TWEEN 80(TM) (monooleato de polioxietileno sorbitán), SPAN 85(TM) (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.
- 5 Pueden usarse mezclas de tensioactivos por ejemplo mezclas TWEEN 80(TM)/SPAN 85(TM). También es adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN 80(TM)) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.
- 10 Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como TWEEN 80(TM)) del 0,01 al 1 %, en particular aproximadamente el 0,1 %; polioxietanoles de octil- o nonilfenoxi (tales como Triton X-100 u otros detergentes de la serie Triton) del 0,001 al 0,1 %, en particular del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) del 0,1 al 20 %, preferentemente del 0,1 al 10 % y en particular del 0,1 al 1 % o aproximadamente el 0,5 %.
- 15 Los adyuvantes de emulsión preferidos tienen un tamaño de gotitas promedio de <1 µm, por ejemplo ≤750 nm, ≤500 nm, ≤400 nm, ≤300 nm, ≤250 nm, ≤220 nm, ≤200 nm o más pequeños. Estos tamaños de gotitas pueden lograrse adecuadamente mediante técnicas tales como microfluidización.
- 20 Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:
- Una emulsión submicrométrica de escualeno, TWEEN 80(TM) y SPAN 85(TM). La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de SPAN 85(TM). En términos de peso, estas relaciones se vuelven el 4,3 % de escualeno, el 0,5 % de polisorbato 80 y el 0,48 % de SPAN 85(TM). Este adyuvante se conoce como "MF59(TM)" (6-7), como se describe con más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 8 y el capítulo 12 de la ref. 9. La emulsión MF59(TM) incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo tampón citrato sódico 10 mM.
 - Una emulsión de escualeno, un tocoferol y TWEEN 80(TM). La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. Puede incluir también SPAN 85(TM) (por ejemplo al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de tocoferol y del 0,3 al 3 % de TWEEN 80(TM) y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤1 ya que proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el TWEEN 80(TM) pueden estar presentes a una relación en volumen de aproximadamente 5:2. Una emulsión tal puede fabricarse disolviendo TWEEN 80(TM) en PBS para dar una solución al 2 %, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL-α-tocoferol y 5 ml de escualeno), después microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas por ejemplo con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.
 - Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100). La emulsión puede incluir también un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
 - Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo un succinato de α-tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo 750 µg/ml de polisorbato 80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de succinato de α-tocoferol) y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes de los 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.
 - Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("PLURONIC(TM) L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" (10) (0,05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualeno, 2,5 % de PLURONIC(TM) L121 y 0,2 % de polisorbato 80). También puede usarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" (11) (5 % de escualeno, 1,25 % de PLURONIC(TM) L121 y 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.
 - Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter de polioxietilenoalquilo (por ejemplo éter cetosteárico de polioxietileno (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófilo (por ejemplo un éster de sorbitán o éster de manida, tales como monooleato de sorbitán o "SPAN 80(TM)"). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos un 90 % de las gotitas de aceite (en

volumen) con un tamaño de menos de 200 nm (12). La emulsión puede incluir también uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo un azúcar, tal como dodecilmaltósida y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.

- 5 • Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care (13). La concentración final (peso) de estos componentes en las vacunas adyuvantadas es el 5 % de escualeno, el 4 % de poloxámero 105 (poliol plurónico) y un 2 % de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).
- 10 • Una emulsión que tiene del 0,5-50 % de un aceite, el 0,01-10 % de un fosfolípido y el 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 14, los componentes de fosfolípido preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gotita submicrométricos son ventajosos.
- 15 • Una emulsión de aceite en agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, TWEEN 80(TM) o SPAN 80 (TM)). Pueden incluirse aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado saponina-lipofila (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 15, producido por la adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetiodioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxiethyl)propanodiamina.
- 20 • Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo un colesterol) se asocian como micelas helicoidales (16).
- 25 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno) (17).
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno) (17).

En algunas realizaciones una emulsión puede mezclarse con un antígeno extemporáneamente, en el momento de la administración y de esta manera el adyuvante y el antígeno pueden mantenerse separadamente en una vacuna empaquetada o distribuida, listos para la formulación final en el momento de su uso. En otras realizaciones una emulsión se mezcla con el antígeno durante la fabricación y de esta manera la composición se empaqueta en una forma adyuvantada líquida. El antígeno estará generalmente en una forma acuosa, de tal manera que la vacuna se prepare finalmente mezclando dos líquidos. La relación en volumen de los dos líquidos de mezcla puede variar (por ejemplo entre 5:1 y 1:5) pero es en general aproximadamente 1:1. Cuando las concentraciones de componentes se dan en las descripciones anteriores de emulsiones específicas, estas concentraciones son típicamente para una composición sin diluir y la concentración después de mezclar con una solución de antígeno disminuirá de esta manera.

Cuando una composición incluye un tocoferol, puede usarse cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero se prefieren los tocoferoles α . El tocoferol puede tomar diferentes formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Puede usarse tanto el D- α -tocoferol como el DL- α -tocoferol. Los tocoferoles se incluyen ventajosamente en las vacunas para su uso en pacientes más mayores (por ejemplo con edades de 60 años o más mayores) debido a que se ha informado que la vitamina E tiene un efecto positivo en la respuesta inmune en este grupo de pacientes (18). También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones (19). Un α -tocoferol preferido es DL- α -tocoferol y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. La sal de succinato se ha descubierto que coopera con los ligandos relacionados con TNF *in vivo*.

45 C. Formulaciones de saponina (capítulo 22 de la ref. 1)

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterogéneo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de un amplio abanico de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novias) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Las fracciones purificadas específicas que usan estas técnicas se han identificado, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la referencia 20. Las formulaciones de saponina pueden comprender también un esterol, tal como colesterol (21).

Las combinaciones de saponinas y colesterolos pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (capítulo 23 de la ref. 1). Los ISCOM típicamente incluyen también un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede usarse en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las ref. 21-22. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional (23).

Puede encontrarse una revisión del desarrollo de los adyuvantes basados en saponina en las ref. 24 y 25.

D. Virosomas y partículas tipo virus

Los virosomas y las partículas tipo virus (VLP) pueden usarse también como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente son no patógenas, no se replican y generalmente no contienen nada del genoma vírico nativo. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse de virus enteros. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o de la cápside), virus de la Hepatitis E, virus del sarampión, virus sindbis, rotavirus, virus de la enfermedad boca manos pies, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tales como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tales como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Las VLP se analizan adicionalmente en las referencias 26-27. Los virosomas se analizan adicionalmente, por ejemplo, en la ref. 28.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos del lipopolisacárido (LPS) enterobacteriano, derivados del Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de los mismos.

Los derivados no tóxicos del LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacetilado (3d-MPL). El 3d-MPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acetilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3 des-O-acetilado se desvela en la ref. 29. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para filtrarse estériles a través de una membrana de 0,22 μ m (29). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen imitadores del monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida por ejemplo RC-529 (30, 31).

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en las ref. 32 y 33.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótido que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótido que contiene una citosina sin metilar enlazada por un enlace fosfato a una guanosina). Los ARN de doble cadena y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también se han demostrado ser inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótido tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. Las referencias 34, 35 y 36 desvelan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo reemplazamiento de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las ref. 37-38.

La secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, tales como el motivo GTCGTT o TTCGTT (39). La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como un CpG-A ODN, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tales como un CpG-B ODN. Los ODN CpG-A y CpG-B se analizan en las ref. 40-41. Preferentemente, el CpG es un CpG-A ODN.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de tal manera que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento de receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótido CpG pueden estar unidas en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las ref. 39 y 42-43.

Un adyuvante CpG útil es CpG7909, conocido también como ProMuneTM (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otro es CpG1826. Como una alternativa, o además, a usar las secuencias CpG, pueden usarse las secuencias TpG (44) y estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG sin metilar. El oligonucleótido inmunoestimulante puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo TTTT, como se desvela en la ref. 44) y/o puede tener una composición de nucleótidos 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 desvela en la ref. 44) y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de citosina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 % etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG sin metilar. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes comprenderán típicamente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

Un adyuvante particularmente útil basado alrededor de los oligonucleótidos inmunoestimulantes se conoce como IC-

31TM (45). De esta manera un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo entre 15-45 nucleótidos) incluyendo al menos uno (y preferentemente múltiples) motivos Cpl (es decir una citosina unida a una inosina para formar un dinucleótido) y (ii) un polímero policationico, tal como un oligopéptido (por ejemplo entre 5-20 aminoácidos) incluyendo al menos una (y preferentemente múltiples) secuencia o secuencias tripeptídicas Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende una secuencia de 26-mero 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO: 51). El polímero policationico puede ser un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de 11-mero KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 52).

Las toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y los derivados detoxificados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina de *E. coli* lábil al calor "LT"), cólera ("CT") o pertusis ("PT"). El uso de toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como adyuvantes mucosos se describe en la ref. 46 y como adyuvantes parenterales en la ref. 47. La toxina o el toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende tanto las subunidades A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las ref. 48-49. Un mutante CT útil es CT-E29H (50). La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 51, específicamente que se refieren solamente para el fin del alineamiento y la numeración de aminoácidos en los mismos.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (52), etc.) (53), interferones (por ejemplo, interferón γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferido es IL-2.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

Los bioadhesivos y los mucoadhesivos pueden usarse también como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado (54) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención (55).

H. Micropartículas

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

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 1)

Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en las ref. 56-57.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (58). Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (59) así como éteres de polioxietileno alquilo o tensioactivos de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico tal como un octoxinol (60). Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: éter de polioxietileno-9-laurilo (laureth 9), éter de polioxietileno-9-estearilo, éter de polioxietileno-8-estearilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo y éter de polioxietileno-23-laurilo.

K. Fosfacenos

Puede usarse un fosfaceno, tal como poli(di(carboxilatofenoxi)fosfaceno) ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 61 y 62.

L. Péptidos de muramilo

Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

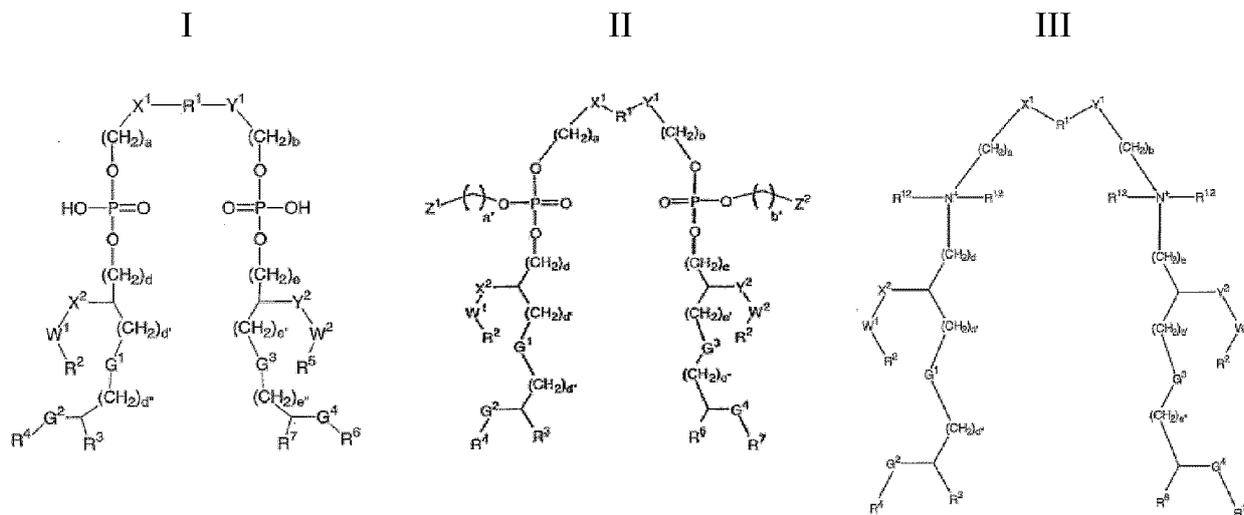
M. Compuestos de imidazoquinolona

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes de la invención incluyen Imiquimod ("R-837") (63, 64), Resiquimod ("R-848") (65) y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo las sales de clorhidrato). Los detalles adicionales acerca de imidazoquinolinas inmunoestimulantes pueden encontrarse en las referencias 66 a 67.

5

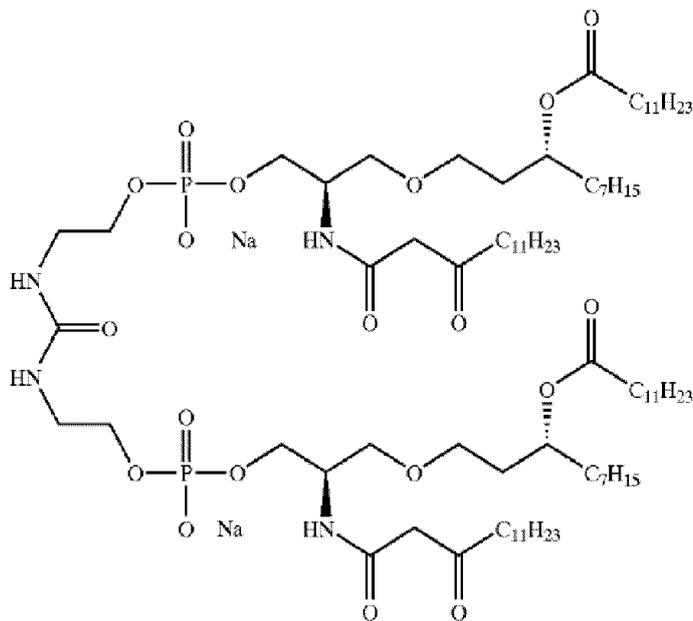
N. Ureas sustituidas

Las ureas sustituidas útiles como adyuvantes incluyen compuestos de fórmula I, II o III o sales de los mismos:

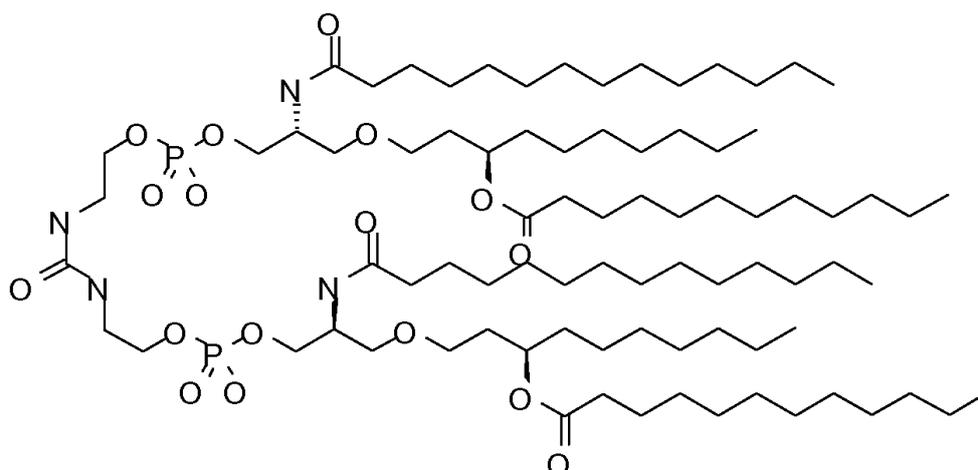


como se definen en la referencia 68, tales como "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", ER 803022 o "ER 804057" por ejemplo:

10



ER804057

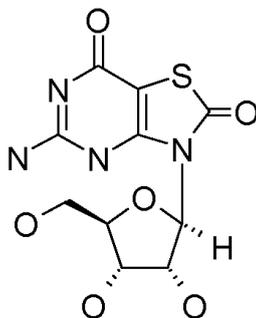


ER-803022:

O. Adyuvantes adicionales

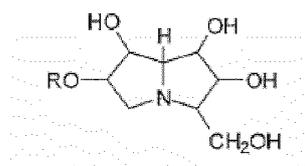
Los adyuvantes adicionales que pueden usarse con la invención incluyen:

- Un derivado de fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como RC-529 (69, 70).
- 5 • Un compuesto de tiosemicarbazona, tales como aquellos desvelados en la referencia 71. Los procedimientos de formulación, fabricación y detección de compuestos activos también se describen en la referencia 71. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .
- 10 • Un compuesto de triptantrina, tales como aquellos desvelados en la referencia 72. Los procedimientos de formulación, fabricación y detección de compuestos activos también se describen en la referencia 72. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .
- Un análogo de nucleósido, tales como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



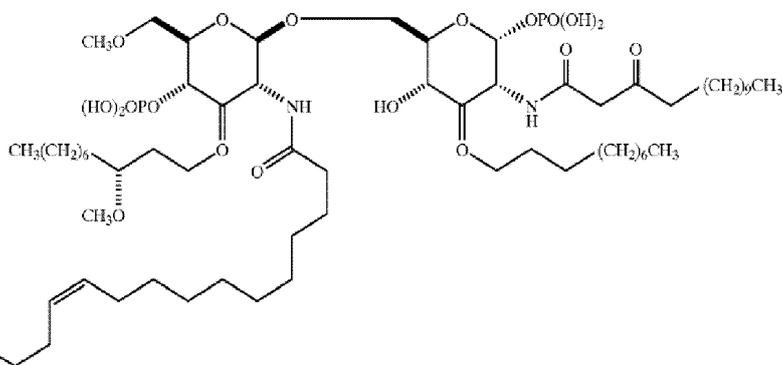
15 y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en las referencias 73 a 74 Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (75).

- Los compuestos desvelados en la referencia 76, incluyendo: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidroisquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de quinolinona de aminobenzimidazol (ABIQ) (77, 78), compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esteroles, compuestos de quinazolinona, compuestos de pirrol (79), compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazolopirimidina y compuestos de benzazol (80).
- 20 • Compuestos que contienen lípidos enlazados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, tales como el antagonista de TLR4 E5564 (81, 82):
- 25 • Un polímero de polioxidonio (83, 84) u otro derivado de polietilen-piperazina N-oxidado.
- Inosín 5'-monofosfato de metilo ("MIMP") (85).
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxiado (86), tal como uno que tenga la fórmula:



donde R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo rectos o ramificados, no sustituidos o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal o derivado farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarin-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

- 5
- Un ligando CD1d, tal como una α -glucosilceramida (87-88) (por ejemplo α -galactosilceramida), α -glucosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 ((2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol), CRONY-101, 3''-O-sulfo-galactosilceramida, etc.
 - Una gamma inulina (89) o un derivado de la misma, tal como algammulina.



10

Combinaciones adyuvantes

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones adyuvantes pueden usarse en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (90); (2) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) (91); (3) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) (92); (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (93); (6) SAF, que contiene escualano al 10 %, TWEEN 80™ al 0,4 %, PLURONIC(TM) al 5 %-copolímero en bloque L121 y thr-MDP, bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometida a vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) Sistema adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualano al 2 %, TWEEN 80(TM) al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS, por sus siglas en inglés, preferentemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

25 Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 1.

El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio se prefiere particularmente, y los antígenos se adsorben generalmente a estas sales. El fosfato cálcico es otro adyuvante preferido. Otras combinaciones preferidas de adyuvantes incluyen combinaciones de adyuvantes Th1 y Th2 tales como CpG y alumbre o resiquimod y alumbre. Puede usarse una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL.

30 Las composiciones de la invención pueden provocar tanto una respuesta inmune mediada por células así como una respuesta inmune humoral. Esta respuesta inmune inducirá preferentemente anticuerpos de larga duración (por ejemplo neutralizantes) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente tras la exposición al patógeno contra el que se inmuniza.

35 Se cree que son necesarios generalmente dos tipos de linfocitos T, CD4 y CD8, para iniciar y/o potenciar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Los linfocitos T CD8 pueden expresar un co-receptor CD8 y se denominan comúnmente linfocitos T citotóxicos (CTL). Los linfocitos CD8 T son capaces de reconocer o interactuar con antígenos mostrados en las moléculas del MHC de clase I.

40 Los linfocitos CD4 T pueden expresar un co-receptor CD4 y se denominan comúnmente linfocitos T ayudantes. Los linfocitos T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a las moléculas del MHC de clase II. Tras la interacción con una molécula de MHC de clase II, los linfocitos CD4 pueden secretar factores tales como citocinas.

Estas citocinas secretadas pueden activar linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos y otras células que participan en una respuesta inmune. Los linfocitos T ayudantes o células CD4+ pueden dividirse además en dos subconjuntos funcionalmente distintos: fenotipo TH1 y fenotipos TH2 que difieren en su función efectora de citocinas.

5 Las células TH1 activadas potencian la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de CTL específicos de antígeno) y son por lo tanto de valor particular en la respuesta a infecciones intracelulares. Las células TH1 activadas pueden secretar uno o más de IL-2, IFN- γ y TNF- β . Una respuesta inmune TH1 puede dar como resultado reacciones inflamatorias locales por la activación de macrófagos, células NK (linfocitos citolíticos naturales, del inglés "*natural killer*") y linfocitos T citotóxicos CD8 (CTL). Una respuesta inmune TH1 puede actuar también expandiendo la respuesta inmune estimulando tanto el crecimiento de linfocitos B y T con IL-12. Los
10 linfocitos B estimulados por TH1 pueden secretar IgG2a.

Las células TH2 activadas potencian la producción de anticuerpos y son por lo tanto de valor en la respuesta a infecciones extracelulares. Las células TH2 activadas pueden secretar una o más de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Una respuesta inmune TH2 puede dar como resultado la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria para la protección futura.

15 Una respuesta inmune potenciada puede incluir uno o más de una respuesta inmune TH1 potenciada y una respuesta inmune TH2.

Una respuesta inmune TH1 puede incluir uno o más de un aumento en los CTL, un aumento en una o más de las citocinas asociadas a una respuesta inmune TH1 (tales como IL-2, IFN- γ y TNF- β), un aumento en los macrófagos activados, un aumento en la actividad NK o un aumento en la producción de IgG2a. Preferentemente, la respuesta
20 inmune TH1 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG2a.

Una respuesta inmune TH1 puede provocarse usando un adyuvante TH1. Un adyuvante TH1 provocará generalmente niveles aumentados de producción de IgG2a con respecto a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH1 adecuados para su uso en la invención pueden incluir por ejemplo formulaciones de saponina, virosomas y partículas tipo virus, derivados no tóxicos de lipopolisacárido (LPS) enterobacteriano,
25 oligonucleótidos inmunoestimulantes. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes, tales como los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, son los adyuvantes TH1 preferidos para su uso en la invención.

Una respuesta inmune TH2 puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citocinas asociadas a una respuesta inmune TH2 (tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), o un aumento en la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria. Preferentemente, la respuesta inmune TH2 potenciada incluirá un aumento en la producción
30 de IgG1.

Una respuesta inmune TH2 puede provocarse usando un adyuvante TH2. Un adyuvante TH2 provocará generalmente niveles aumentados de producción de IgG1 con respecto a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH2 adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones oleaginosas y toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de las mismas.
35 Las composiciones que contienen minerales, tales como sales de alúmina son adyuvantes TH2 preferidos para su uso en la invención.

Preferentemente, la invención incluye una composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y un adyuvante TH2. Preferentemente, dicha composición provoca una respuesta TH1 potenciada y TH2 potenciada, es decir, un aumento en la producción tanto de IgG1 como de IgG2a con respecto a la inmunización sin un adyuvante.
40 Todavía más preferentemente, la composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y uno TH2 provoca una respuesta inmune TH1 aumentada y/o TH2 aumentada con respecto a la inmunización con un único adyuvante (es decir, con respecto a la inmunización con un adyuvante TH1 solo o una inmunización con un adyuvante TH2 solo).

La respuesta inmune puede ser una o ambas de una respuesta inmune TH1 y una respuesta inmune TH2. Preferentemente, la respuesta inmune proporciona una o ambas de una respuesta inmune TH1 potenciada y una
45 respuesta inmune TH2 potenciada.

La respuesta inmune potenciada puede ser una o ambas de una respuesta inmune sistémica y una mucosa. Preferentemente, la respuesta inmune proporciona una o ambas de una respuesta inmune sistémica potenciada y una mucosa potenciada. Preferentemente la respuesta inmune mucosa es una respuesta inmune TH2. Preferentemente, la respuesta inmune mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.
50

Composiciones farmacéuticas

Un aspecto de la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden (a) un conjugado de sacárido como se desvela en el presente documento, (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y (c) opcionalmente un adyuvante como se describe en la sección anterior.

55 Las composiciones de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden

prepararse como inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también pueden prepararse (por ejemplo, una composición liofilizada o una composición secada por congelación-pulverizado). La composición puede prepararse para administración tópica por ejemplo como una pomada, una crema o en polvo. La composición puede prepararse para administración oral por ejemplo como un comprimido o una cápsula, como un pulverizador o como un jarabe (opcionalmente saborizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar por ejemplo como un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizado. La composición puede prepararse como un supositorio o un pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular por ejemplo como gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de tal manera que una composición combinada se reconstituya justo antes de la administración a un paciente. Dichos kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

Cuando una composición ha de prepararse extemporáneamente antes de su uso (por ejemplo cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa ya cargada y un vial, usándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz del antígeno o antígenos (por ejemplo, el polisacárido y/o la proteína vehículo), así como cualquier otro componente, según se necesite. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratarse, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del doctor que trata de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de pruebas rutinarias.

25 **Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna**

La invención también proporciona un procedimiento para elevar una respuesta inmune en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición de la invención. La respuesta inmune es preferentemente protectora e implica preferentemente anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento puede elevar una respuesta de refuerzo.

30 La invención también proporciona un péptido de la invención para su uso como un medicamento por ejemplo para su uso elevando una respuesta inmune en un mamífero.

La invención también proporciona el uso de un péptido de la invención en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmune en un mamífero.

35 La invención proporciona también un dispositivo de administración pre-cargado con una composición inmunogénica de la invención.

Debido a que los glucanos (y los β -glucanos en particular) son un constituyente de polisacárido esencial y principal de casi todos los hongos patógenos, particularmente aquellos implicados en infecciones en sujetos inmunocomprometidos y también en patógenos bacterianos y protozoos, la inmunidad anti-glucano puede tener efectividad contra un amplio intervalo de patógenos y enfermedades. Por ejemplo, el suero anti-glucano elevado después de la inmunización con *S. cerevisiae* tiene reactividad cruzada con *C. albicans*. La inmunidad de espectro amplio es particularmente útil porque, para estos agentes fúngicos infecciosos de humanos, la quimioterapia es escasa, la resistencia a fármacos antifúngicos está emergiendo y la necesidad de vacunas preventivas y terapéuticas se está reconociendo en aumento.

45 Por lo tanto, cuando el inmunógeno de polisacárido de los conjugados de polisacárido desvelados en el presente documento son glucanos, los usos y los procedimientos de los conjugados de polisacárido de glucano desvelados en el presente documento son particularmente útiles para tratar/proteger contra infecciones de: especies de *Candida*, tales como *C. albicans*; especies de *Cryptococcus*, tales como *C. neoformans*; especies de *Enterococcus*, tales como *E. faecalis*; especies de *Streptococcus*, tales como *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. agalactiae* y *S. pyogenes*; especies de *Leishmania*, tales como *L. major*; especies de *Acanthamoeba*, tales como *A. castellanii*; especies de *Aspergillus*, tales como *A. fumigatus* y *A. flavus*; especies de *Pneumocystis*, tales como *P. carinii*; especies de *Mycobacterium*, tales como *M. tuberculosis*; especies de *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*; especies de *Staphylococcus*, tales como *S. aureus*; especies de *Salmonella*, tales como *S. typhimurium*; especies de *Coccidioides* tales como *C. immitis*; especies de *Trichophyton* tales como *T. verrucosum*; especies de *Blastomyces* tales como *B. dermatidis*; especies de *Histoplasma* tales como *H. capsulatum*; especies de *Paracoccidioides* tales como *P. brasiliensis*; especies de *Pythium* tales como *P. insidiosum*; y especies de *Escherichia*, tales como *E. coli*.

Los usos y los procedimientos son particularmente útiles para prevenir/tratar enfermedades incluyendo, pero no limitadas a: candidiasis (incluyendo candidiasis hepatosplénica, candidiasis invasiva, candidiasis mucocutánea crónica y candidiasis diseminada); candidemia; aspergilosis; criptococosis, dermatomicosis, esporotricosis y otras

micosis subcutáneas, blastomicosis, histoplasmosis, coccidiomicosis, paracoccidiomicosis, neumocistosis, afta, tuberculosis, micobacteriosis, infecciones respiratorias, escarlatina, neumonía, impétigo, fiebre reumática, sepsis, septicemia, leishmaniosis cutánea y visceral, acantamebiasis corneana, fibrosis quística, fiebre tifoidea, gastroenteritis y síndrome hemolítico-urémico. La actividad anti-*C. albicans* es particularmente útil para tratar infecciones en pacientes con SIDA.

La efectividad de la inmunización puede ensayarse monitorizando respuestas inmunes contra β -glucano (por ejemplo, anticuerpos anti- β -glucano) después de la administración de la composición. La efectividad del tratamiento terapéutico puede ensayarse monitorizando la infección microbiana después de la administración de la composición de la invención.

El mamífero es preferentemente un humano, pero puede ser, por ejemplo, una vaca, un cerdo, un gato o un perro, ya que la enfermedad por *E. coli* también es problemática en estas especies. Aunque la especificación se refiere a mamíferos y sujetos mamíferos, los conjugados de polisacárido desvelados en el presente documento también son útiles para especies de aves tales como pollos y patos y por lo tanto aunque se diga en el presente documento mamífero o de mamíferos, también pueden incluirse aves. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo un niño o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también puede administrarse a adultos por ejemplo para asegurar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad, etc.

Una manera de comprobar la efectividad del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *E. coli* después de la administración de las composiciones de la invención. Una forma de comprobar la efectividad del tratamiento profiláctico implica monitorizar respuestas inmunes, sistémica (tal como monitorizando el nivel de producción de IgG1 e IgG2a) y/o mucosamente (tal como monitorizando el nivel de producción de IgA), contra los antígenos en las composiciones de la invención después de la administración de la composición. Típicamente, las respuestas de anticuerpos de sueros específicos de antígeno se determinan después de la inmunización pero antes del desafío por lo que las respuestas de anticuerpos mucosos específicos de antígeno se determinan después de la inmunización y después del desafío.

Otra forma de evaluar la inmunogenicidad de las composiciones de la presente invención es expresar las proteínas recombinantemente para explorar los sueros de pacientes o las secreciones mucosas por inmunotransferencia y/o micromatrices. Una reacción positiva entre la proteína y la muestra del paciente indica que el paciente ha montado una respuesta inmune a la proteína en cuestión. Este procedimiento puede usarse también para identificar antígenos inmunodominantes y/o epítomos dentro de antígenos.

La efectividad de las composiciones de vacuna también puede determinarse *in vivo* desafiando modelos animales de infección con *E. coli*, por ejemplo, cobayas o ratones, con las composiciones de vacuna. Un modelo murino de ExPEC y sepsis letal se describe en la referencia 94. Se desvela un modelo de rata de algodón en la ref. 95.

Las composiciones de la invención se administrarán generalmente de forma directa a un paciente. La administración directa puede lograrse por inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscularmente o al espacio intersticial de un tejido) o mucosamente, tal como por administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverizado), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosa. Las formas de administración directa novedosas pueden incluir además la expresión transgénica de los péptidos desvelados en el presente documento en alimentos, por ejemplo, expresión transgénica en una patata.

La invención puede usarse para provocar la inmunidad sistémica y/o mucosa, preferentemente para provocar una inmunidad sistémica y/o mucosa potenciada.

Preferentemente la inmunidad sistémica y/o mucosa potenciada se refleja en una respuesta inmune TH1 y/o TH2 potenciada. Preferentemente, la respuesta inmune potenciada incluye un aumento en la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

La dosificación puede ser un calendario de dosis única o un calendario de dosis múltiple. Las dosis múltiples pueden usarse en un calendario de inmunización primario y/o un horario de inmunización reforzadora. En un calendario de dosis múltiples las diversas dosis pueden darse por la misma o diferentes vías por ejemplo, un cebado parenteral y un refuerzo mucoso, un cebado mucoso y un refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se administrarán típicamente al menos separadas 1 semana (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.).

Las vacunas de la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. De esta manera un paciente humano puede tener menos de 1 año de edad, de 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los más mayores (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y preferentemente ≥ 65 años de edad), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal militar y del servicio armado, mujeres embarazadas, los enfermos crónicos o pacientes inmunodeficientes. Las vacunas no son solamente adecuadas para estos grupos, sin

embargo, y pueden usarse más generalmente en una población.

Las vacunas de la invención son particularmente útiles para pacientes que están esperando una operación quirúrgica u otros pacientes en el hospital. También son útiles en pacientes que se cateterizarán. También son útiles en mujeres adolescentes (por ejemplo con edad 11-18) y en pacientes con infecciones crónicas del tracto urinario.

- 5 Las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud o centro de vacunación) que otras vacunas por ejemplo sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna del sarampión, una vacuna de paperas, una vacuna de rubeola, una vacuna MMR, una vacuna de varicela, una vacuna de MMRV, una vacuna de difteria, una vacuna del tétanos, una vacuna de pertusis, una vacuna DTP, una vacuna conjugada de *H. influenzae* tipo b, una vacuna del virus de la polio inactivado, una vacuna de conjugado meningocócico (tal como una vacuna A-C-W135-Y tetravalente), una vacuna del virus sincitial respiratorio, etc.

General

- 15 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otra manera, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la materia. Dichas técnicas se explican adicionalmente en las referencias bibliográficas. Véanse, por ejemplo, las referencias 96-97, etc.

La expresión “que comprende” abarca “que incluye” así como “que consiste en” por ejemplo una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

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

- 20 En el presente documento se usa la numeración “GI”. Un número GI, o “Identificador de información de gen”, es una serie de dígitos asignados consecutivamente a cada grabación de secuencia procesada por NCBI cuando las secuencias se añaden a sus bases de datos. El número GI no guarda similitud con el número de acceso de la grabación de secuencia. Cuando una secuencia se actualiza (por ejemplo, para corrección, o para añadir más anotaciones o información) entonces recibe un nuevo número GI. De esta manera la secuencia asociada a un GI dado nunca cambia.

- 25 Las referencias a una identidad de secuencia en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y la homología en porcentaje o la identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo aquellos descritos en la sección 7.7.18 de la ref. 98. Un alineamiento preferido se determina por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de hueco abierto de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se desvela en la ref. 99.

- 30 Un experto en la materia entendería que “aislado” significa alterado “por la mano humana” desde su estado natural, es decir, si se da en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un péptido naturalmente presente en un organismo vivo no está “aislado” cuando está en dicho organismo vivo, pero el mismo polinucleótido o péptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, ya que el término se usa en esta divulgación. Además, un polinucleótido o péptido que se introduce en un organismo por transformación, manipulación genética o por cualquier otro procedimiento recombinante se entendería que está “aislado” incluso aunque todavía esté presente en dicho organismo, cuyo organismo puede estar vivo o no, excepto cuando dicha transformación, manipulación genética u otro procedimiento recombinante produce un organismo que de otra manera es indistinguible del organismo de origen natural.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un mecanismo propuesto de acción para vacunas de conjugados de sacárido.

La Figura 2 muestra un nuevo mecanismo propuesto de acción para vacunas de conjugados de sacárido.

- 45 La Figura 3 muestra puntos de unión preferidos para los conjugados y para los conjugados lineales que se usaron en los ejemplos descritos a continuación.

La Figura 4 muestra dos tipos de glucopéptidos: una estructura de conjugado lineal para el conjugado oligoMenC y una estructura de conjugado no lineal para el conj. poliMenC.

- 50 La Figura 5 muestra el esquema químico para preparar los conjugados de oligoMenC-péptido. (a) acetato amónico a una concentración final de 50 mM, cianoborohidruro sódico a una concentración final de 10 mM en una solución de DMSO al 10 % MeOH al 90 % de 1 a 5 mg/ml, 50 °C durante 24-72 h. (b) 10 eq de enlazador sulfo-EMCS con respecto a los grupos amino, 5 eq. de Et_3N , DMSO:H₂O (9:1). (c) 3 eq. de péptidos en PBS 1X, 3 mg/ml en términos de péptido.

La Figura 6 muestra el espectro de RMN ¹H de oligoMenC después de la introducción del grupo maleimido.

La Figura 7 muestra un SDS-PAGE al 4-12 % de Bis-Tris, MES como tampón que corre de un glucopéptido oligoMenC-péptido (carril 3) en comparación con el péptido solo (carril 2); todos los conjugados descritos en los ejemplos tuvieron un perfil de SDS-PAGE similar.

5 La Figura 8 muestra los perfiles de elución de RP-HPLC de conj OligoMenC-Met6 (línea rosa), en comparación con el péptido Met6 (línea azul) y oligoMenC (línea roja) (columna Júpiter C18, gradiente de H₂O - ACN con TFA al 0,1 % desde el 95 % de H₂O y el 5 % de ACN hasta el 45 % de ACN; caudal 0,1 ml/min. Todos los conjugados descritos en los ejemplos mostraron un perfil similar.

10 La Figura 9 muestra el procedimiento químico usado para preparar conjugados poliMenC-péptido (a) EDAC al 20 %, KMUH al 20 % en tampón MES pH 4,56, 2 mg/ml en términos de sacárido; (b) 3 eq. de péptido con respecto a moles de enlazadores introducidos en PBS 1X pH 7, 3 mg/ml en términos de péptido.

La Figura 10 muestra un espectro de RMN ¹H representativo de un polisacárido después de la derivatización con KMUH que muestra la incorporación de aproximadamente 35 mol de grupos maleimido por mol de cadena de sacárido.

15 La Figura 11 muestra un SDS-PAGE representativo al 4-12 % de Bis-Tris con MES como tampón que corre de un conjugado poliMenC-péptido (carril 3) en comparación con el péptido solo (carril 2). Todos los conjugados mostraron una tendencia similar.

20 La Figura 12 muestra un conjunto representativo de perfiles de RP-HPLC de conjugado poliMenC-Met6 (línea rosa), en comparación con el péptido Met6 solo (línea azul) y poliMenC solo (línea negra). Columna Júpiter C18, gradiente de H₂O - ACN con TFA al 0,1 % desde el 95 % de H₂O y el 5 % de ACN hasta el 45 % de ACN; caudal 0,1 ml/min. Todos los conjugados descritos en los ejemplos mostraron un perfil similar.

25 La Figura 13 muestra perfiles de RP-HPLC de conj OligoMenC-Met6 (línea rosa) en comparación con conj poliMenC-Met6 (línea roja), mostrando una interacción diferente con la columna C18. Columna Júpiter C18, gradiente de H₂O - ACN con TFA al 0,1 % desde el 95 % de H₂O y el 5 % de ACN hasta el 45 % de ACN; caudal 0,1 ml/min. Todos los conjugados descritos en los ejemplos mostraron un perfil similar.

La Figura 14 muestra títulos de IgG producidos por conjugados poliMenC contra Met6 y el péptido Fba como se determina por ensayo ELISA (recubriendo placas con péptidos), informado como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 0,2.

30 La Figura 15 muestra títulos de IgG producidos por conjugados poliMenC contra los respectivos glucoconjugados como se determina por ensayo ELISA (recubriendo placas con glucopéptidos), informado como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 0,2.

La Figura 16 muestra un espectro de RMN ¹H representativo de polisacárido después de la derivatización con enlazador KMUH, que muestra la introducción de 1 mol de enlazador por aproximadamente 16 mol de sacárido.

35 La Figura 17 muestra un SDS-PAGE representativo al 4-12 % de Bis-Tris con MES como tampón que corre de un conjugado poliMenC-péptido (carril 3) en comparación con el péptido solo (carril 2). Todos los conjugados mostraron una tendencia similar.

La Figura 18 muestra el procedimiento usado para preparar conjugados poliMenC-Péptido (a) EDAC al 20 %, 2,3 eq. de enlazador KMUH en tampón MES pH 4,56, 2 mg/ml en términos de sacárido; (b) 3 eq. de péptido con respecto a moles de enlazadores introducidos en PBS 1X pH 7, 3 mg/ml en términos de péptido.

40 La Figura 19 muestra perfiles de HPLC de conjugado N-terminal poliMenc-PV1 (línea rosa) en comparación con péptido libre (línea azul) y polisacárido solo (línea negra); HPLC-SEC, columna Superdex Peptide, NaPi 20 mM, NaCl 250 mM, pH 7, 0,05 ml/min, condición isocrática. Todos los conjugados mostraron un perfil similar.

La Figura 20 muestra un espectro de RMN ¹H representativo de polisacárido después de la derivatización con enlazador BMPH, que muestra la introducción de 1 mol de enlazador por aproximadamente 17 mol de sacárido.

45 La Figura 21 muestra un SDS-PAGE representativo al 4-12 % de Bis-Tris con MES como tampón que corre de un conjugado poliMenC-péptido (carril 3) en comparación con el péptido solo (carril 2). Todos los conjugados mostraron una tendencia similar.

50 La Figura 22 muestra el procedimiento usado para preparar los conjugados poliMenC-Péptido (a) EDAC al 20 %, 2,3 eq. de enlazador BMPH en tampón MES pH 4,56, 2 mg/ml en términos de sacárido; (b) 3 eq. de péptido con respecto a moles de enlazadores introducidos en PBS pH 7, 3 mg/ml en términos de péptido.

La Figura 23 muestra un SDS-PAGE representativo al 4-12 % B-T con MES como tampón que corre de un conjugado poliMenC-péptido MIX (carril 3) en comparación con mezcla de péptidos (carril 2).

- La Figura 24 muestra el procedimiento usado para preparar conjugados poliMenC-péptido MIX (a) EDAC al 20 %, 2,3 eq. de enlazador BMPH en tampón MES pH 4,56, 2 mg/ml en términos de sacárido; (b) mezcla de 1 eq. de cada péptido (3 eq. en total con respecto a moles de enlazadores) PBS pH 7.
- La Figura 25 muestra el espectro de RMN ¹H del péptido Fba.
- 5 La Figura 26 muestra el espectro de RMN ¹H del péptido Met6.
- La Figura 27 muestra el espectro de RMN ¹H del péptido Hpw1.
- La Figura 28 muestra el espectro de RMN ¹H del conjugado enlazado a Fba, Hpw1 y Met6 en relación 1:1:2.
- La Figura 29 muestra los diferentes conjugados en comparación con el segundo conjunto de ensayos de inmunogenicidad.
- 10 La Figura 30 muestra los títulos de IgG inducidos por conjugados poliMenC contra el CPS de serogrupo C meningocócico como se determina por ensayo ELISA, informado como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.
- La Figura 31 muestra los títulos de IgG inducidos por conjugados poliMenC-PV1 C y N terminales contra el polisacárido meningocócico de serogrupo C, en el post 2 (azul) y el post 3 (rojo) como se determina por ensayo ELISA, informado como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.
- 15 La Figura 32 muestra los títulos de IgM inducidos por conjugados poliMenC-PV1 C y N terminales contra el polisacárido meningocócico de serogrupo C (rojo) en comparación con títulos de IgG (verde) como se determina por ensayo ELISA, informado como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.
- La Figura 33 muestra los títulos de IgG inducidos por conjugados poliMenC-PV1 C y N terminales contra los péptidos respectivos, como se determina por ensayo ELISA, informado como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.
- 20 La Figura 34 muestra la estructura química de las unidades de repetición del polisacárido meningocócico de serogrupo C, W-135 e Y.
- La Figura 35 muestra el procedimiento químico usado para preparar conjugados de péptido Ova con poliMenW y poliMenY (a) NaIO₄ 0,1 M 30 de ácido siálico mol en NaPi 10 mM pH 7 para obtener 10 mg/ml en términos de sacárido, 2 h, t.a. en oscuridad (b) NaBH₃CN (2 eq.), péptido Ova (1,5 eq.) en NaPi 50 mM NaCl 200 mM pH 7, 5 días a 37 °C.
- 25 La Figura 36 muestra el espectro de RMN ¹H del serogrupo W-135 de polisacárido meningocócico después de la oxidación de ácido siálico (30 %).
- La Figura 37 muestra el espectro de RMN ¹H del serogrupo Y de polisacárido meningocócico después de la oxidación de ácido siálico (30 %).
- 30 La Figura 38 muestra un SDS-PAGE representativo al 4-12 % de Bis-Tris, MES como tampón que corre de conjugados **12** (carril 3) y **13** (carril 4) en comparación con el péptido Ova (carril 2).
- La Figura 39 muestra el procedimiento químico usado para preparar conjugados de péptido PoliMenC-Ova (a) EDAC al 20 %, 2,3 eq. de enlazador KMHU o enlazador BMPH en tampón MES pH 4,56, 2 mg/ml en términos de sacárido; (b) 3 eq. de péptido Ova GGC con respecto a moles de enlazadores introducidos en PBS 1X pH 7, 3mg/ml en términos de péptido.
- 35 La Figura 40 muestra un SDS-PAGE al 4-12 % de Bis-Tris, MES como tampón que corre de conjugados **14** y **15**.
- La Figura 41 muestra el procedimiento químico usado para preparar conjugados de péptido PoliMenC-Ova (a) EDAC 1 eq. sulfo NHS 1 eq., péptido Ova 1 eq. en MES pH 6, 3 mg/ml en términos de péptido.
- 40 La Figura 42 muestra un SDS-PAGE al 4-12 % de Bis-Tris MES como tampón que corre del conjugado poliMenC-Ovap **16**.
- La Figura 43 muestra títulos de IgG inducidos por conjugados PoliMenC-Péptido Ova contra el serogrupo C polisacárido meningocócico, determinados por ensayo ELISA, informados como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.
- 45 La Figura 44 muestra títulos de IgG inducidos por conjugados PoliMenC-Péptido Ova contra el serogrupo C polisacárido meningocócico en post 2 (azul) y post 3 (rosa), determinados por ensayo ELISA, informados como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.
- La Figura 45 muestra títulos de IgG inducidos por conjugados PoliMenW-Péptido Ova y PoliMenY-Péptido Ova

contra el serogrupo W e Y polisacárido meningocócico respectivamente, determinados por ensayo ELISA, informados como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.

5 La Figura 46 muestra títulos de IgG inducidos por conjugados PoliMenC-W-Y-Péptido Ova contra el péptido Ova, determinados por ensayo ELISA, informados como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.

La Figura 47 muestra títulos inducidos por conjugados PoliMenC-PV1 C y N terminales contra el serogrupo C polisacárido meningocócico para diferentes subtipos de IgG, determinados por ensayo ELISA, informados como GMT (media geométrica con intervalo de confianza del 95 %), corte de OD 1.

10 La Figura 48 muestra un ELISA competitivo entre el polisacárido meningocócico nativo del serogrupo C y (A) el conjugado poliMenC (línea naranja), (B) el epítipo PV1 con enlazador N terminal solo (azul) y (C) control negativo de sacárido laminarina (verde), determinado por ensayo ELISA, informado como inhibición en porcentaje.

Ejemplos

Vista global

15 La enfermedad meningocócica recibe una atención de la salud pública prominente debido a su aparición extremadamente rápida y su progreso; la enfermedad puede ser fatal en cuestión de horas. Los polisacáridos de superficie han sido durante mucho tiempo antígenos clave para vacunas contra los serogrupos meningocócicos A, C, W-135 e Y causantes principales de enfermedad [Bardotti, A. y col. *Vaccine*, 2008, 26(18), 2284-2296; Broker, M. y col. *Vaccine*, 2009, 27(41), 5574-5580; Fusco, P.C. y col. *Clin Vaccines Immunol.* 2007, 14(5), 577-584.]. La conjugación de polisacáridos a una proteína vehículo ha conferido importantes beneficios a la salud pública, mejorando su inmunogenicidad y permitiendo la inducción de una respuesta dependiente de linfocitos T (TD) [Pollard, A.J. y col. *Nat. Rev. Immunol.* 2009, 9(3), 213-220; Ada, G. y col. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003, 9(2), 79-85]. De esta manera, los sacáridos de los serogrupos meningocócicos proporcionan un sacárido ejemplar para la ilustración de los conjugados desvelados en el presente documento. Para investigar los conjugados no lineales y los conjugados de poliepítipos PV1, los presentes inventores estudiaron las propiedades inmunológicas de los conjugados de sacárido, donde la proteína vehículo entera se sustituyó con péptidos de epítipos de linfocitos T sintéticos con conjugación lineal o bien no lineal.

30 Como se describe a continuación, se conjugó un primer panel de péptidos en su C terminal a los oligosacáridos del serogrupo C meningocócico. Los péptidos derivaron de la proteína de la pared celular de *Candida albicans* [Xin, H. y col. *PNAS* 2008, 105, 13526-13531] y de epítipos de la toxina tetánica usados en el péptido vehículo poliepítipo N19 [Baraldo, K. y col. *Infect. Immun.* 2004, 72,4884-4887]. Los péptidos se conjugaron a dos sacáridos de serogrupo C meningocócico diferentes: un oligosacárido (oligoMenC) y un polisacárido (poliMenC). Ninguno de los conjugados (formulados con o sin hidróxido de aluminio como adyuvante) indujo una respuesta IgG contra los sacáridos. Solamente el conjugado poliMenC-Fba y el conjugado poliMenC-Met6 indujeron una respuesta IgG contra los péptidos (ambos de la proteína de la pared celular de *Candida albicans*).

40 La inmunogenicidad de los conjugados y los conjugados podrían verse afectados por varios parámetros, tales como el enlace del péptido al péptido en o cerca de su N terminal frente a su C terminal, el grado de carga peptídica en la cadena de sacárido, la longitud del enlazador o espaciador, ya sea que todos los péptidos sean el mismo epítipo o haya diferentes epítipos unidos al sacárido [véase, por ejemplo, Chong, P. y col. *Infection and Immunity*, 1997, 65, 4918-4925]. Todos estos parámetros se evaluaron en los ejemplos a continuación, pero ninguno de los parámetros demostró ser relevante (probablemente debido a los péptidos seleccionados para el primer conjunto de experimentos que proporcionan solamente baja inmunogenicidad como epítipo de linfocito T). A partir del ensayo de un segundo panel de péptidos, los presentes inventores descubrieron que el péptido PV1, derivado de la proteína del virus de la polio tipo 1, fue un sustituto particularmente eficaz para las proteínas vehículo tradicionales; en particular, el péptido PV1, enlazado en su N terminal, indujo títulos de anticuerpos comparables con una proteína vehículo convencional: un conjugado MenC-CRM.

50 Adicionalmente, ya que un péptido derivado de la proteína ovoalbúmina (OVA) también ha demostrado ser un péptido vehículo eficaz para el polisacárido GBS tipo III [Avci1, F.Y. y col. *Nature Medicine*, 2011, 17, 1602-1610], los presentes inventores demostraron en los ejemplos a continuación que el péptido es capaz de sustituirse por conjugados proteína vehículo entera tradicional-sacárido tales como los conjugados de polisacáridos meningocócicos del serogrupo C, W-135 e Y. La evaluación inmunológica a continuación muestra que el péptido Ova fue un buen vehículo para el polisacárido meningocócico del serogrupo C, pero no fue tan bueno para los polisacáridos meningocócicos del serogrupo W-135 e Y.

Introducción

55 Para la ronda inicial de experimentos, los epítipos de linfocitos T se conjugaron a oligosacáridos meningocócicos a partir del serogrupo C como conjugados lineales y a polisacáridos meningocócicos del serogrupo C como conjugados no lineales. Los presentes inventores usaron epítipos de linfocitos T, seleccionaron dos péptidos

derivados de tétanos (P30TT y P32TT) del péptido vehículo poliepítipo N19, un péptido recombinante diseñado con múltiples epítipos de linfocitos T CD4+ derivados de diferentes patógenos. Los presentes inventores también ensayaron cinco péptidos (Hpw1, Eno1, Gap1, Fba, Met6) derivados de las proteínas de la pared celular de *Candida albicans*.

- 5 Estos péptidos sintéticos se obtuvieron de un laboratorio externo. Los péptidos se sintetizaron con un enlazador peptídico en el C terminal para la unión al sacárido.

Los péptidos P30TT y P32TT usados en estos ejemplos derivaron de los epítipos de la toxina tetánica encontrados en el péptido N19. El péptido N19 es un péptido vehículo poliepítipo diseñado por ingeniería genéticamente expresado en *Escherichia coli* y que consiste en varios epítipos universales de linfocitos T CD4+ humanos, que se comporta como un vehículo fuerte cuando se conjuga al polisacárido Hib. Los estudios con células humanas *in vitro* mostraron que estos epítipos en el péptido N19 se procesaban y reconocían correctamente y eran capaces de inducir una proliferación de linfocitos T específicos de epítipo. Estudios posteriores mostraron que se habían generado precursores de linfocitos T específicos para los epítipos (P32TT, P30TT, P23TT) *in vivo* en ratones después de la inmunización con conjugados N19-MenACWY; otros resultados demostraron claramente que las células presentadoras de antígenos de ratón *in vitro* eran capaces de procesar el péptido N19 y de generar los epítipos correctos que, a su vez, eran capaces de reactivar los linfocitos T específicos, cebados por la inmunización *in vivo* con el péptido único [Baraldo, K. y col. Infect Immun. 2005, 73(9), 5835-5841]. Los péptidos adicionales para este primer conjunto de ejemplos se seleccionaron de las proteínas de la pared celular de *Candida albicans* en base a su expresión conocida durante la patogénesis de la candidiasis humana diseminada que incluían: proteína de la pared de las hifas 1 (Hpw1), enolasa (Enol), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Gap1), fructosa-bisfosfato aldolasa (Fba) y metiltetrahidropteriltriglutamato (Met6). Después de la inmunización de ratones, usando una estrategia de vacunas a base de células dendríticas (DC) pulsadas por antígeno, los conjugados con manotriosa sintética unida β -1,2 acoplada a cada péptido sintético eran inmunogénicos; además la vacunación mostró además protección contra la candidiasis diseminada experimental [Xin, H. y col. PNAS, 2008, 105, 13526-13531]. Los estudios adicionales han demostrado que, entre todos estos péptidos, Fba solo indujo una respuesta de anticuerpos y protección contra la candidiasis.

Para este primer conjunto de experimentos, los presentes inventores usaron oligosacáridos con *av* DP18 (grado promedio de polimerización) y polisacáridos nativos (de longitud completa) del serogrupo C de *Neisseria meningitidis* que se extrajeron y purificaron de bacterias.

Las vacunas de conjugados de serogrupo C meningocócico monovalente se han introducido exitosamente en muchos países a lo largo del mundo, Menjugate® y Meningitec™, donde la proteína vehículo es CRM₁₉₇ o NeisVac-C™ donde el vehículo es TT o Menitorix® donde MenC se conjuga a TT en combinación con Hib [Trotter, C.L. y col. Lancet, 2004, 364(9431), 365-7; Balmer, P. y col. J Med Microbiol, 2002, 51(9), 717-22]. Además se han desarrollado vacunas de conjugado tetravalente que abarcan los serogrupos A, C, W135 e Y, contribuyendo a reducir fuertemente la incidencia de la meningitis en todo el mundo. Las vacunas de conjugado meningocócico tetravalente actualmente disponibles en el mercado, Menactra™, Menveo® y Nimenrix™, difieren en la longitud de la cadena de sacáridos, la proteína vehículo (DT, CRM₁₉₇ y TT respectivamente) y la química de conjugación [Gasparini, R. y Panatto, D. Human Vaccines 2011, 7(2), 170-82; Jackson, L.A. y col. Clin Infect Dis 2009, 49(1), 1-10; Reisinger, K.S. y col. Clin Vaccines Immunol 2009, 16(12), 1810-5; Halperin, S.A. y col. Vaccines 2010, 28(50), 7865-72]. De esta manera hay una abundancia de datos con respecto a los sacáridos del serogrupo C meningocócico conjugados a proteínas vehículo tradicionales que pueden compararse con los conjugados de la presente invención.

Se realizó un segundo conjunto de experimentos evaluando algunas características que pueden influir en la inmunogenicidad de los glucopéptidos, tales como péptidos unidos en el N terminal frente a péptidos unidos en el C terminal, la densidad de los péptidos unidos a la cadena de sacárido, diferentes longitudes de enlazador a péptidos conjugados al sacárido, uso de péptidos con diferentes epítipos unidos a la misma cadena de sacárido. Hay una cantidad justa de referencias bibliográficas que pueden proporcionar al experto en la materia una guía adicional con respecto a cómo estos parámetros afectarán a la inmunogenicidad de los conjugados desvelados en el presente documento. Por ejemplo, los resultados obtenidos con los glucoconjugados de *Haemophilus influenzae* tipo b sugieren que la orientación del resto de sacárido con respecto al epítipo de linfocito T podría influir a la respuesta inmune del hospedador al sacárido. Los conjugados de sacárido con el péptido unido a los sacáridos en el C terminal de los péptidos inducen 5-10 veces menos respuesta de anticuerpos anti-sacárido que sus isómeros posicionales enlazados a través del N-terminal de los péptidos [Chong, P. y col. Infection and Immunity, 1997, 65, 4918-4925]. Estos resultados se apoyaron por el trabajo de Alonso De Velasco donde el polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* conjugado al N terminal de un epítipo de linfocito T provocó una respuesta de anticuerpos anti-PS significativamente mayor que la provocada por el conjugado con PS acoplado al C terminal del péptido. La diferencia en la inmunogenicidad para los conjugados con el PS en el C terminal se debió a la incapacidad de las células presentadoras de antígenos de escindir eficazmente el epítipo de linfocito T (C terminal) de PS y presentarlo en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II a los linfocitos T ayudantes [De Velasco, E.A. y col. Infection and Immunity, 1995, 63, 961-968]. Los estudios en los modelos de trabajo de un glucopéptido mostraron que este último conjugado podía unirse a las moléculas de MHC de clase II y provocaron respuestas de linfocitos T específicos. De hecho, fueron capaces de generar hibridomas de linfocitos T

específicos contra el glucopéptido pero no contra el péptido no glucosilado correspondiente. Además el resto de carbohidrato tuvo una influencia conformacional importante en el determinante reconocido por los linfocitos T; los linfocitos T reconocían restos peptídicos bajo la influencia de carbohidratos, la posición del hapteno en el péptido fue crítica para el reconocimiento de linfocitos T. Además la distancia entre el hapteno del sacárido y el péptido podía influir en la inmunogenicidad [Harding, C.V. y col. The Journal of Immunology, 1993, 151, 2419-2425].

Con este fondo en mente, los presentes inventores ensayaron conjugados con enlazadores de diferente longitud, para reducir la distancia entre el linfocito B (sacárido) y el epítipo de linfocito T (péptido).

Con respecto a la carga de péptido, en los conjugados de *Haemophilus influenzae* tipo b, los autores han descrito que la presentación de múltiples copias de un antígeno peptídico en un sistema de esqueleto de polilisina (MAP) podría potenciar su inmunogenicidad; de manera que se incorporaron múltiples epítipos de linfocitos T en la construcción para superar la restricción genética del MHC de clase II. Estos estudios mostraron que la inmunogenicidad de los glucopéptidos podría potenciarse cuando se usó un sistema MAP como vehículo en lugar de un péptido lineal [Chong, P. y col. Infection and Immunity, 1997, 65, 4918-4925].

Basándose en esto, los presentes inventores prepararon conjugados donde los péptidos se acoplan a la cadena de polisacáridos en una forma de conjugados no lineales que permita mayor carga peptídica y permita que se acoplen diferentes péptidos en el mismo sacárido, pero en distinto péptido a diferencia de los péptidos vehículo poliepítipo tales como el péptido N19.

En este conjunto de experimentos, los presentes inventores también ensayaron otros péptidos de epítipo de linfocitos T sintéticos, incluyendo el péptido P2TT que es otro péptido del epítipo de la toxina tetánica usado en el péptido N19 [Baraldo, K. y col. Infect. Immun. 2004, 72, 4884-4887]⁴ y el péptido PV1 identificado como un epítipo de linfocito T de la proteína VP1 del virus de la polio tipo 1 [Leclerc, C. y col. Journal of Virology, 1991, 65, 711-718.]. En el campo de la investigación de la vacuna contra el cáncer, el péptido PV1 se ha usado en una estructura de glucoproteína de antígeno múltiple (MAG) dendrítica conjugada a un antígeno Tn, un marcador de tumor glucosídico. El MAG:Tn-PV fue capaz de inducir anticuerpos IgG anti-Tn que reconocían líneas celulares tumorales humanas y el protocolo de inmunización realizado con este inmunógeno completamente sintético aumentó la supervivencia de ratones que tenían tumores [Bay, S. y col. J. Peptide Res. 1997, 49, 620-625; Lo-Man, R. y col. Cancer Research, 1999, 59, 1520-1524].

Finalmente, los ejemplos demostraron la capacidad inmunológica del péptido Ova derivado de la proteína Ovoalbúmina para sustituir por la proteína vehículo entera tradicional conjugada a sacáridos tales como el serogrupo W-135, Y y C de polisacárido meningocócico. De hecho, Avcil y col. mostraron que este péptido Ova ha sido un buen vehículo para el polisacárido GBS tipo III [Avcil, F.Y. y col. Nature Medicine, 2011, 17, 1602-1610].

Avcil y col. compararon la respuesta inmune de la vacuna de polisacárido GBS tipo III-OVAp con aquella del glucoconjugado de polisacárido GBS tipo III-OVA construido por la tecnología usada actualmente en la fabricación industrial de varias vacunas. El estudio mostró que III-Ovap construido para maximizar la presentación de epítipos de linfocitos T específicos de carbohidratos fue 50-100 veces más potente y sustancialmente más protector en un modelo de ratón neonatal de infección de *Streptococcus* grupo B con respecto a una vacuna construida por procedimientos usados actualmente por la industria de las vacunas [Avcil, F.Y. y Kasper, D.L. Annu. Rev. Immunol. 2010, 28, 107-130; Paoletti, L.C. y Kasper, D.L. Expert Opin. Biol. Ther. 2003, 3(6), 975-984].

Resultados

Detección de péptidos de epítipos de linfocitos T con orientación C terminal: caracterización físico-química y evaluación inmunológica en modelo de ratón

Para demostrar la efectividad de los conjugados, los presentes inventores ensayaron péptidos sintéticos que contenían epítipos de linfocitos T de diferentes fuentes y que combinan varias características que podrían afectar a la inmunogenicidad tales como la orientación espacial de los péptidos, la densidad de péptidos en la cadena de polisacárido y la multipresentación de diferentes tipos de péptidos.

En el primer conjunto de experimentos, se seleccionaron siete péptidos: dos de ellos fueron epítipos derivados de la toxina tetánica y se usaron en el péptido N19 y cinco de ellos fueron epítipos derivados de las proteínas de la pared celular de *Candida albicans*.

Tabla 2 muestra las secuencias de aminoácidos y el organismo fuente para cada péptido

Nombre del péptido	Fuente	Secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO]
P32TT	Toxina tetánica	LKFIKRYTPNNEIDS- [1]
P30TT	Toxina tetánica	FNNFTVSFWLRVPKVSAHLE- [2]
Hpw	<i>Candida albicans</i>	QGETEEALIQRYSY- [3]

(continuación)

Enol	<i>Candida albicans</i>	DSRGNPTVEVDFTT- [4]
Gap1	<i>Candida albicans</i>	NRSPSTGEQKSSGI- [5]
Fba	<i>Candida albicans</i>	YGKDVKDLFDYAE- [6]
Met6	<i>Candida albicans</i>	PRIGGQRELKITE- [7]

5 Estos péptidos se obtuvieron de un laboratorio externo que contenía un enlazador equipado con un grupo tiol libre (Gly-Gly-Cys) para introducir el antígeno sacárido en el C terminal. Se proporcionaron como productos puros al menos para el 85 % después de la purificación por HPLC en fase inversa.

Los sacáridos eran el oligosacárido meningocócico avDP 18 del serogrupo C (para su uso en los conjugados) y el polisacárido meningocócico del serogrupo C (para su uso en los conjugados). Sus cadenas nativas se caracterizan por el ensamblaje de las moléculas de ácido siálico como unidades de repetición (véase, por ejemplo, la Figura 3).

10 Los conjugados se prepararon conjugando los diferentes péptidos a los oligosacáridos para los conjugados ("oligoMenC") y a los polisacáridos para los conjugados ("poliMenC"), obteniendo dos estructuras diferentes: conjugados lineales o conjugados no lineales. Los conjugados oligoMenC-péptido se sintetizaron como conjugados lineales caracterizados por tener una relación molar 1:1 entre el oligosacárido y el epítipo peptídico porque el sacárido solamente se derivatizó con un enlazador en el extremo reductor. Los conjugados poliMenC-péptido se sintetizaron como conjugados no lineales caracterizados por epítipos peptídicos estando enlazados a lo largo de la cadena del polisacárido nativo debido a la introducción de enlazadores en los grupos carboxilo de las moléculas de ácido siálico a lo largo de la cadena de sacárido (véase, por ejemplo, la Figura 4).

Conjugados OligoMenC

20 El oligosacárido meningocócico del serogrupo C, después de una aminación reductora, se derivatizó con sulfo-EMCS (éster de N-épsilon-maleimidocaproil-oxisulfosuccinimida). De esta manera, se introdujo un maleimido en el extremo reductor de la cadena de sacárido capaz de reaccionar con el grupo tiol libre de cada péptido (Figura 5).

El oligosacárido después de la derivatización se purificó por precipitación con acetona y después se caracterizó por RMN ¹H, confirmando la introducción del resto maleimido en el extremo reductor (Figura 6).

25 Después de la derivatización y la conjugación durante toda la noche, la reacción de conjugación se confirmó por SDS-Page al 4-12 % de Bis-Tris (véase, por ejemplo, la Figura 7). Se obtuvieron los siete conjugados oligoMenC cada uno con un péptido diferente unido a través de su C terminal.

Los conjugados se purificaron por cromatografía de exclusión de tamaño, usando una columna pre-empaquetada Superdex Peptide para retirar el péptido libre y se siguió de precipitación con sulfato amónico para retirar el sacárido libre.

30 Los glucopéptidos purificados se caracterizaron por análisis de RP-HPCL usando una columna Júpiter C18 (Figura 8). Solamente se incluye un perfil de HPLC ejemplar para el conjugado oligoMenC-Met6; todos los conjugados mostraron perfiles similares.

35 Como se muestra en el perfil HPLC, los conjugados oligoMenC después de la conjugación mostraron un comportamiento intermedio entre el péptido y el oligoMenC solos, porque se retuvo en la columna durante un tiempo más largo que oligoMenC pero un tiempo más corto que el péptido (línea rosa).

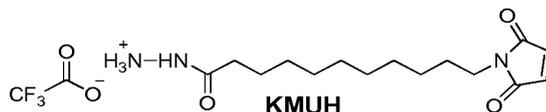
Después de la purificación, el contenido de proteínas se estimó por ensayo colorimétrico MicroBCA y el contenido de ácido siálico por ensayo colorimétrico de resorcinol. La relación entre el sacárido y el péptido fue aproximadamente 1:1 Para todos los glucopéptidos de acuerdo con la preparación de una estructura lineal y tomando en consideración que el resto oligoMenC es una polidispersión, como se indica en la tabla 3.

Muestra	Sacárido MenC	Sacárido/péptido (mol/mol)
P32TT-MenC 2a	Oligo avDP 18	0,7
P30TT-MenC 2b	Oligo avDP 18	0,7
Met6-MenC 2c	Oligo avDP 18	0,8
Gap1-MenC 2d	Oligo avDP 18	0,7
Hpw1-MenC 2e	Oligo avDP 18	0,7
Eno1-MenC 2f	Oligo avDP 18	0,8
Fba-MenC 2g	Oligo avDP 18	0,8

40

Conjugados poliMenC

El polisacárido meningocócico del serogrupo C se derivatizó para introducir un resto maleimido capaz de reaccionar con el grupo tiol de cada péptido. Se usó un enlazador KMHU (hidrazida-TFA de ácido N-kappa-maleimidoundecanoico) ya que es capaz de reaccionar con grupos carboxilo del ácido siálico usando química EDAC (clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) (la Figura 9 muestra el esquema de reacción). En este primer conjunto de experimentos se introdujo 1 mol de enlazador KMHU por aproximadamente 35 mol de sacárido, como se evidencia por el espectro de RMN ¹H (véase la Figura 10).



En este primer conjunto de experimentos se usó KMHU con 10 átomos de carbono en el enlazador para evitar problemas de impedimento estérico en la reacción de conjugación con péptidos.

Después de la introducción de restos maleimido en la cadena de sacáridos, la reacción de conjugación con cada péptido se ha realizado apropiadamente en tampón fosfato y después de una noche se formaron los glucopéptidos, como se evidencia por SDS-Page al 4-12 % Bis-Tris (Figura 11).

Los siete glucopéptidos se purificaron por corte de vivaspina de 30 kDa para retirar el péptido libre y después se caracterizaron por RP-HPLC usando una columna C18. Solamente se proporciona un ejemplo de los perfiles de HPLC para el conjugado poliMenC-Met6; todos los conjugados mostraron un perfil similar (Figura 12). Estos conjugados se retuvieron en la columna RP-HPLC más tiempo que el péptido solo debido a las interacciones hidrófobas aumentadas con la columna probablemente debido a la presencia de más péptidos en la cadena de sacárido. Por otro lado, el sacárido poliMenC solo no se retuvo por la columna y se eluyó en el volumen vacío de la columna.

Después de la purificación, el contenido de sacárido y el contenido de proteína de los conjugados se determinaron usando ensayos colorimétricos, en particular ensayo de resorcinol y de micro BCA respectivamente.

Como se informa en la tabla 4 los siete glucopéptidos preparados con poliMenC mostraron una estructura no lineal, con una multipresentación de los epítomos peptídicos en la cadena de sacárido.

Muestra	Sacárido MenC	Sacárido/péptido (mol resto ácido siálico/mol péptido)
P32TT-MenC 4a	polisacárido	25,8
P30TT-MenC 4b	polisacárido	25,6
Met6-MenC 4c	polisacárido	26,9
Gap1-MenC 4d	polisacárido	23,0
Hpw1-MenC 4e	polisacárido	26,3
Eno1-MenC 4f	polisacárido	24,7
Fba-MenC 4g	polisacárido	22,2

Con este enfoque, se obtuvieron siete conjugados lineales con una relación de aproximadamente 1:1 oligoMenC:péptido y se obtuvieron siete conjugados no lineales con múltiples copias del mismo epítipo peptídico en cada cadena de sacárido poliMenC. Los perfiles de HPLC confirmaron su estructura, evidenciando una interacción diferente con la columna C18 entre los conjugados oligoMenC y los conjugados poliMenC, debido a diferentes relaciones de sacárido-péptido (Figura 13). De esta manera los conjugados oligoMenC y los conjugados poliMenC tienen diferentes presentaciones de epítomos de linfocitos T peptídicos.

Evaluación inmunológica del primer conjunto de conjugados

Los conjugados preparados descritos anteriormente se ensayaron en estudios inmunológicos en ratones.

La inmunogenicidad se evaluó en ratones Balb/c. Se usaron grupos de ocho ratones. Los conjugados se formularon con hidróxido de aluminio como adyuvante. Se formularon solos o en mezcla con una dosificación de 1 µg o 0,2 µg en términos de sacárido (Tabla 5); también se incluyó un grupo de ratones vacunados con la mezcla de conjugados poliMenC sin adyuvante. Los conjugados oligoMenC-CRM y oligoMenC-TT se usaron como controles positivos; PBS más adyuvante se usó como un control negativo. Los conjugados se administraron subcutáneamente el día 1, 14 y 28. Los animales vacunados y control se desangran 14 días después de la segunda y la tercera inyecciones de conjugado.

Grupo	Nombre del antígeno	Adyuvante	Dosis de antígeno (basándose en el contenido de sacárido)
1	PBS	Alumbre	-
2	Péptidos + poliMenC	Alumbre	0,2 μ + 1 μ g
3	Met6-oligoMenC	Alumbre	1 μ g
4	Met6-poliMenC	Alumbre	1 μ g
5	Gap1-oligoMenC	Alumbre	1 μ g
6	Gap1-poliMenC	Alumbre	1 μ g
7	Hpw1-oligoMenC	Alumbre	1 μ g
8	Hpw1-poliMenC	Alumbre	1 μ g
9	Eno1-oligoMenC	Alumbre	1 μ g
10	Eno1-poliMenC	Alumbre	1 μ g
11	Fba-oligoMenC	Alumbre	1 μ g
12	Fba-poliMenC	Alumbre	1 μ g
13	CRM 197-oligoMenC	Alumbre	1 μ g
14	TT-oligoMenC	Alumbre	1 μ g
15	Mezcla 5 oligoMenC	Alumbre	1 μ g cada uno (5 μ g tot)
16	Mezcla 5 poliMenC	Alumbre	1 μ g cada uno (5 μ g tot)
17	Mezcla 5 oligoMenC	Alumbre	0,2 μ g cada uno (1 μ g tot)
18	Mezcla 5 poliMenC	Alumbre	0,2 μ g cada uno (1 μ g tot)
19	Mezcla 5 poliMenC	Ninguno	1 μ g cada uno (5 μ g tot)

En primer lugar, el conjunto de sueros después de la tercera inmunización por ensayo ELISA se analizó para determinar el contenido de IgG anti-poliMenC. Ninguno de los conjugados oligoMenC o conjugados poliMenC fueron capaces de inducir la respuesta IgG a los sacáridos.

- 5 Se ha informado que la administración de glucopéptidos puede inducir también una respuesta IgG contra el resto peptídico, también se analizó la respuesta IgG anti-péptido. Después de los análisis de sueros por ensayo ELISA, las únicas respuestas IgG contra los péptidos se habían inducido por poliMenC conjugado a Met6 y Fba, solos o en mezcla (Figura 14), con o sin adyuvante.

- 10 Estos dos conjugados también eran capaces de inducir títulos de IgG contra los respectivos glucopéptidos como se muestra en la Figura 15.

A partir de la detección de estos epítomos de linfocitos T con orientación C terminal, solamente se observaron respuestas de IgG a los conjugados contra los péptidos Fba y Met6 (epítomos de las proteínas de la pared celular de *Candida albicans*), indicando un desplazamiento de la respuesta inmune a reconocer solamente el resto peptídico.

- 15 *Influencia de la orientación peptídica, la carga peptídica en una cadena de sacárido, la longitud del enlazador y la multipresentación de diferentes péptidos: caracterización físico-química y evaluación inmunológica en modelo de ratón*

Se realizó un estudio adicional para evaluar parámetros adicionales que pueden influir en la inmunogenicidad de los glucopéptidos.

- 20 Empezando a partir de los ejemplos previos, solamente se ensayaron los polisacáridos meningocócicos de serogrupo C en conjugados.

- 25 Se ensayaron varias características: péptidos unidos en el N terminal frente a péptidos unidos en el C terminal; una densidad más alta de péptidos en la cadena de sacáridos; diferente longitud del enlazador para conjugar péptidos con poliMenC reduciendo la distancia entre el linfocito B y el epítomo de linfocito T; multipresentación de diferentes péptidos en la misma cadena de sacárido. Adicionalmente, también se ensayaron péptidos de epítomo de linfocitos T sintéticos, incluyendo P2TT (otro epítomo peptídico derivado de la toxina tetánica y usó la proteína N19) y el PV1 (un epítomo de linfocito T peptídico derivado de la proteína VP1 del virus de la polio tipo 1) (tabla 6).

Péptidos	Fuente	Secuencia [SEQ ID NO]	Enlazado en	Enlazador
Fba	<i>Candida albicans</i>	YGKDVKDLFDYAQE [6]	C-Terminal	-G-G-Cys-SH
Fba	<i>Candida albicans</i>	YGKDVKDLFDYAQE [6]	N-Terminal	HS-CH ₂ -CH ₂ -CO-NH-
P2TT	Toxina tetánica	QYIKANSKFIGITE [8]	C-Terminal	-G-G-Cys-SH
P2TT	Toxina tetánica	QYIKANSKFIGITE [8]	N-Terminal	HS-CH ₂ -CH ₂ -CO-NH-
PV1	Virus de la polio	KLFAVWKITYKDT [9]	C-Terminal	-G-G-Cys-SH
PV1	Virus de la polio	KLFAVWKITYKDT [9]	N-Terminal	HS-CH ₂ -CH ₂ -CO-NH-

En este estudio, un enlazador equipado con un grupo tiol libre se introdujo en el C terminal o el N terminal de péptidos seleccionados induciendo una orientación espacial diferente de los mismos.

Glucopéptidos con densidad peptídica más alta

- 5 Para potenciar la densidad de los péptidos en la cadena de sacárido, el grado de derivatización de la cadena de polisacárido se aumentó usando el mismo enlazador KMUH para introducir aproximadamente 1 mol de enlazador por aproximadamente 16 mol de sacárido como se confirma por RMN ¹H (Figura 16).

- 10 Las posteriores reacciones de conjugación con cada péptido (N y C terminal) se mostraron haberse completado usando SDS-Page al 4-12 % Bis-Tris (véase, por ejemplo, la Figura 17) después de una noche a t.a., obteniendo conjugados no lineales con una carga más alta de péptidos epítomos en la cadena de sacárido para ensayar en estudios inmunológicos (véase la Figura 18).

- 15 Los conjugados se purificaron por vivaspina 30 kDa para retirar el péptido libre. Solamente no se recuperó el conjugado con PV1 enlazado en el C terminal. Durante la purificación, se formó un gel haciendo difícil resolubilizarlo. Este problema se debió probablemente a la derivatización aumentada del sacárido con un enlazador KMUH lipófilo más largo y la posterior introducción de un péptido con varios aminoácidos hidrófobos.

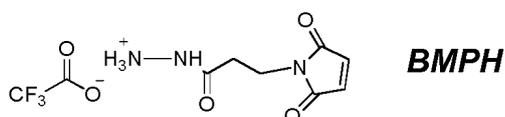
Después de la purificación, los glucopéptidos se caracterizaron por HPLC-SEC usando una columna Superdex Peptide. Solamente se proporciona un ejemplo representativo (el péptido PV1 N terminal); todos los conjugados mostraron perfiles similares (Figura 19).

- 20 La columna júpiter C18 no fue apropiada para estas conjugaciones porque las interacciones hidrófobas eran más altas con la columna debido a que se estaba aumentando la densidad de los péptidos en la cadena de sacáridos. Finalmente el contenido de sacárido se determinó por ensayo de ácido siálico y el contenido de proteínas por ensayo micro BCA o por ensayo de Lowry para PV1 con enlace C y N terminal; estos datos confirmaron la introducción de 1 mol de péptidos por aproximadamente 16 mol de sacárido (véase la tabla 7).

Muestra	Sacárido MenC	Sacárido/péptido (mol resto ácido siálico/mol péptido)
Fba C-term poliMenC 6a	Polisacárido	14,6
Fba N-term poliMenC 6b	Polisacárido	18,6
P2TT C-term poliMenC 6c	Polisacárido	12,5
P2TT N-term poliMenC 6d	Polisacárido	21,7
PV1 N-term poliMenC 6e	Polisacárido	11,2

- 25 *Conjugados con un enlazador más corto: BMPH*

- 30 También se usó otro enlazador bifuncional para derivatizar un polisacárido que era más corto que KMUH para reducir la distancia entre el antígeno de sacárido y los péptidos de epítipo de linfocito T. Se usó BMPH (hidrazida-TFA de ácido N-β-maleimidopropiónico) como el enlazador para introducir grupos maleimido en los grupos carboxilo de la cadena de sacárido usando química EDAC, reduciendo la distancia entre el sacárido y el epítipo de linfocito T a solamente dos átomos de carbono.



Después de la derivatización del polisacárido MenC con enlazador BMPH, los presentes inventores introdujeron 1 mol de grupo maleimido por aproximadamente 17 mol de sacárido, permitiendo la preparación de glucopéptidos con una densidad peptídica más alta usando también este enlazador (Figura 20).

Una vez derivatizado, las reacciones de conjugación con cada péptido se mostraron haberse completado durante una noche a t.a., como se evidencia por SDS-Page al 4-12 % Bis-Tris (Figura 21 y Figura 22).

- 5 Los conjugados se purificaron por vivaspina 30 kDa para retirar el péptido libre; excepto para los conjugados con PV1 unido en el C terminal y en el N terminal que se purificaron por cromatografía de exclusión de tamaño usando una columna pre-empaquetada Superdex Peptide. Después de la purificación el sacárido y el contenido de proteínas se determinaron respectivamente por ensayos colorimétricos de ácido siálico y micro BCA o Lowry; estos datos confirmaron la introducción de 1 mol de péptido por aproximadamente 17 mol de sacárido (Tabla 8).

Muestra	Sacárido MenC	Sacárido/péptido (mol resto ácido siálico/mol péptido)
Fba C-term poliMenC 8a	Polisacárido	14,6
Fba N-term poliMenC 8b	Polisacárido	15,8
P2TT C-term poliMenC 8c	Polisacárido	12
P2TT N-term poliMenC 8d	Polisacárido	9,8
PV1 N-term poliMenC 8f	Polisacárido	9
PV1 N-term poliMenC 8g	Polisacárido	10,9

- 10 De esta manera se obtuvieron seis glucopéptidos que combinan diferentes características: péptido de densidad más alta, distancia más corta entre el antígeno sacárido y los péptidos de epítipo y uso de péptidos con diferente orientación espacial.

Conjugados con multipresentación de diferentes péptidos en la misma cadena de sacárido

- 15 Se conjugaron diferentes péptidos al mismo sacárido poliMenC para evaluar si la presencia simultánea de diferentes péptidos en la cadena de sacárido podía inducir una respuesta inmune contra MenC. Se usaron los siguientes péptidos: Fba, Met6 y Hpw1 (C-terminal) cuyas estructuras se informaron en la tabla 2. Estos péptidos se seleccionaron en la base de las señales distintivas de RMN ¹H, no comunes a cada péptido, permitiendo después de su conjugación una evaluación sencilla por experimentos de RMN ¹H.

Estos péptidos se conjugaron a poliMenC después de la introducción del resto maleimido con enlazador BMPH (compuesto **7a** en la Figura 24).

- 20 La reacción de conjugación se realizó en una noche a t.a. como se evidencia por SDS-PAGE 4-12 % Bis-Tris (Figura 23). La reacción se ha llevado a cabo añadiendo la mezcla de péptidos a la solución de polisacárido (Figura 24).

El conjugado se purificó por vivaspina corte de 30 kDa para retirar los péptidos libres y el espectro de RMN ¹H del conjugado confirmó la introducción de tres péptidos diferentes (Figura 28).

- 25 Para diferenciar entre Met6, Hpw1 y Fba en una cadena de sacárido los presentes inventores usaron análisis de RMN ¹H para analizar los espectros de RMN ¹H de cada péptido y evaluando algunas señales representativas.

Como se muestra en la Figura 25 en la secuencia de aminoácidos de Fba hay 2 Tyr (8H) y 1 Phe (5H) cuyos protones mostraron señales entre 6 y 7,5 ppm, 1 Leu (6H) y 1 Val (6H) con señales alrededor de 1 ppm.

En la estructura del péptido Met6, los presentes inventores identificaron 2 Ile (12H) y 1 Leu (6H) con señales a aproximadamente 1 ppm (Figura 22).

- 30 Para el péptido Hpw1, hay 1 Tyr (4H) cuyos protones estaban en aproximadamente 7 ppm, 1 Ile (6H) y 1 Leu (6H) con señales a aproximadamente 1 ppm (Fig 23).

A partir del espectro de RMN ¹H del glucopéptido los presentes inventores determinaron que la relación entre los diferentes péptidos fue Fba:Hpw1:Met6 = 1:1:2.

- 35 Como se muestra en la Figura 28 por integración de protones aromáticos los presentes inventores identificaron una relación 1:1 entre Fba y Hpw1. La asignación de los protones de Val, Ile, Leu permitió definir la cantidad de Met6 con respecto a Fba y Hpw1. La integración de las señales mostró que los presentes inventores introdujeron 2 mol de péptido Met6 con respecto a los péptidos Fba y Hpw1 (Figura 28).

El contenido de sacárido de conjugado puro se estimó por ensayo colorimétrico de ácido siálico, mientras que el contenido en la proteína se determinó por ensayo colorimétrico de micro BCA.

- 40 La inmunogenicidad de estos conjugados con diferentes péptidos sintéticos conjugados a la misma cadena de poliMenC se comparó con los conjugados con solo un tipo de péptido conjugado a una cadena de sacárido.

Se usó poliMenC-BMPH **7a** para preparar conjugados respectivamente con Met6 y Hpw1; el conjugado Fba-MenC **8a** ya se había preparado (Tabla 8).

Muestra	Sacárido MenC	Sacárido/péptido (mol resto ácido siálico/mol péptido)
Fba C-term poliMenC 8a	Polisacárido	14,6
Fba C-term, Met6, Hpw1-C-term poliMenC 9	Polisacárido	11,8
Met6 C-term poliMenC 9a	Polisacárido	11,3
Hpw1 C-term poliMenC 9b	Polisacárido	13

Evaluación inmunológica del segundo conjunto de conjugados

5 Los conjugados se ensayaron en un segundo estudio inmunológico en ratones. La inmunogenicidad se evaluó en ratones Balb/c usando grupos de ocho ratones. Los conjugados se formularon con hidróxido de aluminio como el adyuvante, con una dosis de 1 µg (basándose en el contenido de sacárido). El OligoMenC-CRM se usó como control positivo; el PBS más adyuvante se usó como control negativo. Los conjugados se administraron subcutáneamente el día 1, 14 y 28. Los animales vacunados y control se desangran 14 días después de la segunda y la tercera inyecciones de conjugado.

10 Los sueros en post 3 se analizaron por ensayo ELISA para determinar el contenido de IgG anti-poliMenC. Todos los conjugados preparados con péptidos Fba, P2TT, Met6 y Hpw1 solamente mostraron baja inmunogenicidad en ratones. Además, la evaluación de diferentes parámetros de estos péptidos sintéticos (péptidos con orientación N, una densidad más alta de péptidos en la cadena de sacárido, enlazador con diferente longitud, multipresentación de diferentes péptidos en la misma cadena de sacárido) no dio lugar a diferencias significativas debido a la baja inmunogenicidad observada. Estos péptidos seleccionados probablemente solo se reconocieron de forma pobre como epítomos de linfocitos T y por lo tanto fueron buenos candidatos por sí mismos para reemplazar a la proteína vehículo entera (Figura 30).

15 Un péptido de epítomo de linfocito T, el péptido PV1 sintético derivado de la proteína del virus de la polio tipo 1, se encontró ser un buen vehículo para el polisacárido meningocócico de serogrupo C. Como se muestra en la

20 Figura 30, los conjugados **8f** y **8g** preparados con el péptido PV1 fueron altamente inmunogénicos, induciendo títulos de IgG significativos contra poliMenC en comparación con los ratones control, inmunizados con PBS más adyuvante (P valor) 0,0007).

25 En particular, el péptido PV1 con enlazador en el N terminal indujo niveles de IgG comparables con aquellos inducidos por el conjugado oligoMenC-CRM convencional (sin diferencias significativas entre el conjugado MenC-CRM frente al conjugado MenC-PV1 N term., p-valor = 0,5625). Más importante, como se muestra en la siguiente tabla 14, el conjugado de péptido PV1 fue capaz de inducir una respuesta bactericida en suero que fue tan fuerte como el conjugado oligoMenC-CRM convencional.

Títulos de SBA de conejo (MenC11) >8192 post3	
PBS	<16
MenC-CRM	>8192
Fba C-term-MenC (KMUH) conj Lot1 4g	<16
Fba C-term-MenC (KMUH) conj 6a	<16
Fba N-term-MenC (KMUH) conj 6b	<16
Fba C-term-MenC (BMPH) conj 8a	<16
Fba N-term-MenC (BMPH) conj 8b	<16
P2TT C-term-MenC (BMPH) conj 8c	<16
P2TT N-term-MenC (BMPH) conj 8d	<16
PV1 C-term-MenC (BMPH) conj 8f	2048
PV1 N-term-MenC (BMPH) conj 8g	8192
Fba, Met6, Hpw1-MenC (BMPH) conj 9	<16
Met6 C-term-MenC (BMPH) conj 9a	<16
Hpw1 C-term-MenC (BMPH) conj 9b	<16

Los análisis de sueros después de la segunda y la tercera inmunizaciones (Figura 31) mostraron un efecto de refuerzo para ambos conjugados (diferencias significativas entre post2 y post3 para el conjugado PV1 C term **P = 0,0036 y para el conjugado PV1 N term ***P = 0,0008).

5 Además, los análisis adicionales de suero en post3 (Figura 32) mostraron que el contenido de IgM anti-MenC inducida por los conjugados fue muy baja. Estos datos evidencian que ocurrió un desplazamiento de isotipo IgM a IgG y los glucopéptidos con péptidos PV1 fueron capaces de inducir una respuesta celular de memoria.

10 Una observación adicional importante fue que los títulos de IgG contra este péptido se encontraron muy bajos para PV1 C terminal y casi inexistentes para PV1 N terminal (Figura 33), mostrando que este péptido podría ser un buen candidato como vehículo en la sustitución de una proteína vehículo entera. La Figura 48 también muestra los diferentes subtipos de IgG inducidos por los conjugados no lineales de péptido PV1.

Caracterización físico-química y evaluación de inmunogenicidad en modelo de ratón de glucoproteínas preparadas con péptido Ova como vehículo

Detección de diferentes epítomos de linfocitos B para ensayar el péptido Ova como un vehículo

15 Un ejemplo adicional implica el uso del péptido sintético de Ovoalbúmina (OVA) como proteína vehículo. Partiendo de las referencias bibliográficas en las que el péptido Ova se mostró ser un buen vehículo para el polisacárido GBS tipo III, también se ensayó la capacidad de sustituir a la proteína vehículo entera en combinación con otros antígenos de linfocitos B tales como el polisacárido meningocócico serogrupos W-135, Y y C.

En este ejemplo, el péptido Ova sintético se enlazó en su C terminal.

Péptido	Fuente	Secuencia de aminoácidos	Enlazador
Ovap	Ovoalbúmina (OVA)	N-acetil-ISQAVHAAHAEINEAGR-	-E-S-G-K-NH ₂
Ovap	Ovoalbúmina (OVA)	N-acetil-ISQAVHAAHAEINEAGR-	-G-G-Cys-SH

20 Como se informa en la tabla, se usó un péptido Ova sintético con 2 enlazadores diferentes en el C terminal:

- enlazador E-S-G-K con grupo amino libre para preparar conjugados con los polisacáridos meningocócicos serogrupos W-135 e Y (aminación reductiva después de la oxidación de ácido siálico) y con polisacáridos meningocócicos serogrupo C (después de la derivatización de grupos carboxilo).
- 25 - enlazador G-G-C con grupo tiol libre para preparar conjugados usando poliMenC derivatizado con grupos maleimido (compuesto **7a** y **5a** usados en ejemplos previos) para tener una comparación con los ejemplos previos.

Síntesis de conjugados de péptido Ova con polisacárido meningocócico serogrupos W-135 e Y.

30 Para preparar conjugados con poliMenW-135 e Y, se realizó una reacción de oxidación de ácido siálico (oxidación al 30 % con respecto a la unidad de repetición), seguido de aminación reductora con el péptido Ova en presencia de hidruro de sodiocianoboro (Figura 35).

En primer lugar los presentes inventores realizaron la reacción de oxidación de ácido siálico con *meta*-periyodato sódico, obteniendo un 30 % de grado de oxidación de acuerdo con la diana deseada. Los polisacáridos oxidados se purificaron por vivaspina corte de 30 kDa y se caracterizaron por RMN ¹H para estimar el porcentaje de oxidación (Figuras 36-37).

35 Como se muestra en las Figuras 36-37, se estimó el porcentaje de oxidación, considerando la señal con respecto al protón del aldehído hidratado; de hecho, las señales de RMN de protón, esperadas tanto para el aldehído como para la forma de hidrato de aldehído, se revelaron solamente para la forma de hidrato de aldehído a 5,15 ppm, ya que la condición experimental usada para recoger el experimento movió el equilibrio hacia el mismo.

40 Después de la oxidación de ácido siálico, se realizaron las siguientes reacciones de conjugación con péptidos por aminación reductora en presencia de cianoborohidruro sódico. Ambas reacciones se llevaron a cabo a 37 °C durante 5 días y después funcionaron apropiadamente como se evidencia por SDS-Page 4-12 % Bis-Tris (Figura 38).

Ambos conjugados se purificaron por vivaspina corte de 30 kDa para retirar el exceso de péptido. Después de la purificación los dos conjugados se caracterizaron en términos de contenido de sacárido y de péptido usando respectivamente ensayos colorimétricos de resorcinol y de Lowry.

45 Estos datos mostraron que se han introducido aproximadamente 1 mol de péptido por 4 mol de ácido siálico (Tabla 12), obteniendo glucopéptidos con una alta densidad de epítomo de linfocito T en una cadena de sacárido.

Muestra	Sacárido/péptido (mol sacárido/mol péptido)
conjugado Ovap-MenW 12	4
conjugados Ovap-MenY 13	3,6

Síntesis de conjugados de péptido Ova con polisacárido meningocócico serogrupo C.

Los conjugados del péptido Ova se prepararon con polisacáridos meningocócicos de serogrupo C usando dos enfoques sintéticos diferentes:

- 5 1- El péptido Ova con enlazador G-G-C en el C terminal se conjugó con poliMenC derivatizado con grupos maleimido (compuesto 7a y 5a);
- 2- El péptido Ova con enlazador E-S-G-K en el C terminal se conjugó a grupos carboxilo del poliMenC usando química EDAC.

10 Para el primer enfoque, se usó poliMenC derivatizado con enlazador KMUH (5a) o con BMPH (7a), con una introducción de 1 mol de grupo maleimido por aproximadamente 16-17 mol de ácido siálico. De esta manera el grupo tiol libre en el péptido fue capaz de reaccionar con el resto maleimido de la cadena de sacáridos y las reacciones de conjugación se realizaron como se describe previamente (Figura 39).

15 Las dos reacciones se llevaron a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente, como se evidencia por SDS-Page 4-12 % Bis-Tris (Figura 33), obteniendo dos conjugados con dos enlazadores diferentes (KMUH y BMPH) entre el epítipo del linfocito T y el epítipo del linfocito B (**14** y **15**).

Los glucopéptidos se purificaron por vivaspina corte de 30 kDa para retirar el péptido libre.

Los conjugados puros se caracterizaron en términos de contenido de sacárido y de péptido usando respectivamente ensayos colorimétricos de resorcinol y de Lowry. Estos datos mostraron la introducción de 1 mol de enlazadores por aproximadamente 15-18 mol de ácido siálico (tabla 13).

Muestra	Sacárido/péptido (mol sacárido/mol péptido)
Conjugado Ovap GGC-MenC (KMUH) 14	15,2
Conjugados Ovap GGC-MenC (BMPH) 15	18,3

20 Para el segundo enfoque, el conjugado poliMenC-Ovap usando el péptido con el enlazador E-S-G-K, se usó la reacción de condensación entre el grupo amino libre del péptido y los grupos carboxilo de MenC para obtener un enlace amida.

25 La reacción se realizó en presencia de EDAC y Sulfo-NHS para activar los grupos carboxilo en el sacárido para la reacción con el grupo amino del péptido (Esquema 8).

Como la primera etapa, una mezcla de EDAC y sulfo-NHS (un equivalente con respecto al mol de sacárido) se añadió a una solución de polisacárido en MES 0,03 M pH 6. La reacción se llevó a cabo en agitación cuidadosa en oscuridad durante 15 minutos y después se añadió la solución de péptido Ova (1 eq) en agua.

Después de una noche a temperatura ambiente el SDS-Page mostró que la reacción funcionó (Figura 42).

30 El conjugado **16** se ha purificado por vivaspina corte de 30 kDa y el conjugado puro se ha caracterizado en términos de contenido de sacárido y de péptido. El conjugado **16** Ovap-MenC tuvo una relación baja de Sacárido/péptido (mol sacárido/mol péptido) de 80. Los intentos de aumentar la carga de péptido en MenC no fueron exitosos y de hecho el aumento de EDAC provocó que el polisacárido formara una clase de gel que no se re-solubilizó debido a reacciones secundarias. Aumentar la cantidad de péptido provocó problemas durante la etapa de purificación.

35 De esta manera los presentes inventores usaron este conjugado en estudios inmunológicos en ratones, también si la carga de péptido fue baja con respecto a los conjugados **12**, **13**, **14** y **15**.

Evaluación inmunológica de los conjugados con péptido Ova como vehículo.

40 Los conjugados con péptido Ova como vehículo se ensayaron en estudios inmunológicos en ratones. La inmunogenicidad se evaluó en ratones Balb/c usando grupos de ocho ratones. Los conjugados se formularon con hidróxido de aluminio como adyuvante, con una dosis de 1 µg (basándose en el contenido de sacárido). Se usaron oligoMenC-CRM, oligoMenW-CRM y oligoMenY-CRM como control positivo; PBS más adyuvante se usó como control negativo. Los poli conjugados se administraron subcutáneamente el día 1, 14 y 18. Los animales vacunados y control se desangraron 14 días después de la segunda y la tercera inyecciones de conjugado.

El ensayo ELISA de los sueros post 3 mostró que solamente los glucopéptidos con péptido Ova conjugado al serogrupo C de polisacárido meningocócico se encontraron ser inmunogénicos en ratones en comparación con los ratones control, inmunizados con PBS más adyuvante (P valor < 0,05), como se informa en la Figura 43. En particular el conjugado Ovap-MenC con el péptido Ova acoplado usando el enlazador KMUH fue el más inmunogénico (P valor = 0,006 con respecto a los ratones control).

El análisis de IgG anti-sacárido en post2 en comparación con post3 evidenció que para los conjugados **14** y **15** hubo un efecto de refuerzo (P valor < 0,05), en particular para Ovap-MenC (enlazador KMUH) con un p valor de 0,0033. Por el contrario, el conjugado Ovap(ESGK)-MenC (**16**) no produjo un efecto de refuerzo (P valor 0,0594) (Figura 44).

Sin embargo, todos los conjugados con péptido Ova indujeron una respuesta de IgG anti-MenC menor en comparación con el conjugado MenC-CRM (diferencias significativas entre MenC-CRM frente a conjugados Ovap-MenC ***P = 0,0009).

Los otros conjugados con los polisacáridos de serogrupos W e Y meningocócicos (**12** y **13**), solamente fueron poco inmunogénicos o no observables inmunogénicos (Figura 45). Como se informa en la Figura 45, los sueros post3 no indujeron títulos de IgG anti-sacáridos; no hubo diferencia en comparación con los ratones control, inmunizados con PBS más adyuvante (P>0,05). Los títulos de IgG anti-Ovap, después de la tercera inmunización, mostraron que todos los glucopéptidos indujeron respuestas de anticuerpos contra el péptido incluso si los títulos no fueron muy altos; en particular el glucopéptido con poliMenC conjugado con el enlazador KMUH indujo los títulos de IgG anti-péptido más altos que se informan en la Figura 46.

Material y procedimientos usados en los ejemplos

Preparación de oligo y polisacáridos de serogrupo C, W e Y meningocócicos

Introducción de grupos amino primarios en el extremo reductor de los oligosacáridos del serogrupo C meningocócico por aminación reductora

El oligosacárido **1** se trató por aminación reductora para introducir un grupo amino en el extremo reductor del sacárido. Esta reacción se realizó en un disolvente orgánico, de tal manera que el oligosacárido se intercambiara por bromuro de tetrabutilamonio (TBA) como contraión. Para introducir este contraión, los presentes inventores realizaron una cromatografía de intercambio iónico usando la resina CAPTO S, equilibrada con TAB 0,7 M y eluyeron el oligosacárido de la columna con TAB⁺ como contraión. Después el producto seco (20 mg) se disolvió en DMSO al 10 %, metanol al 90 % a una concentración final de 5 mg/ml de ácido siálico. Se añadieron después acetato amónico (concentración final de 50 mM) y cianoborohidruro sódico (concentración final de 10 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 24-72 horas a 50 °C. El metanol en exceso se retiró después por un rotavapor al vacío hasta que el volumen fue menor de o igual a dos veces la cantidad de DMSO añadido en primer lugar a la aminación reductora. Después de eso, la mezcla de reacción se diluyó con NaCl a 0,5 M para obtener una solución con un 20 % de MeOH. El sacárido se purificó después por cromatografía de exclusión de tamaño usando una resina G10 para retirar los reactivos de aminación reductiva del oligoMenC aminado. Finalmente, el contraion TAB se intercambió de nuevo con la resina CAPTO S equilibrada con NaCl 1 M, de manera que el oligosacárido **1a** se eluyó de la columna con Na⁺ como contraión. La cantidad de grupos amino introducidos se estimó por ensayo colorimétrico [Habeb AF Anal Biochem 1966, 14, 328-38], que indicó que la aminación fue aproximadamente el 50 % (como se confirma posteriormente por su espectro de RMN ¹H).

Derivatización de oligoMenC-NH₂ con éster de N-ε-maleimidocaproil-oxisulfosuccinimida (sulfo-EMCS)

Después de la aminación reductiva, el oligosacárido **1a** se solubilizó en una mezcla de H₂O-DMSO 1:9, después se añadieron 5 eq. de Et₃N seguido de la adición de 10 eq. de enlazador sulfo-EMCS. La reacción se mantuvo a t.a. en agitación suave durante 2 horas. El oligosacárido **1b** derivatizado se separó después de los reactivos por precipitación con acetona 1:4, seguido de lavado del precipitado con acetona 1:4 y el secado al vacío.

La introducción de grupos maleimido en la cadena de oligosacárido se confirmó por el espectro de RMN ¹H.

Derivatización de polisacárido MenC con hidrazida-TFA de ácido N-k-maleimidoundecanoico (KMUH)

Los grupos carboxilo del ácido siálico del serogrupo C de polisacárido meningocócico **3** se hicieron reaccionar con grupos hidrazida en el enlazador KMUH para introducir restos maleimido en la cadena de sacárido de manera que los péptidos epítipo puedan unirse en una forma no lineal. Para realizar la reacción, el polisacárido **3** se solubilizó en MES 0,1 M pH 4,56 a una concentración final de 2 mg/ml; después se añadió EDAC (20 % en moles) y la reacción se mantuvo en agitación suave en oscuridad. Después de 10 minutos, se añadió KMUH (20 % en moles o 46 % en moles para introducir 1 mol de enlazador por aproximadamente 35 mol de ácido siálico o por aproximadamente 17 mol de ácido siálico, respectivamente) a la mezcla y la reacción se llevó a cabo a t.a. durante 2 horas en agitación suave. Finalmente el polisacárido derivatizado se purificó por filtración de flujo tangencial con una membrana de corte de 30 kDa (Sartorius) y el polisacárido derivatizado se recuperó en el retenido.

La cantidad de grupos maleimido en la cadena de sacárido se estimó por el espectro de RMN ¹H: los presentes

inventores introdujeron 1 mol de resto maleimido por aproximadamente 35 mol de ácido siálico (**3a**) o 1 mol de resto maleimido por aproximadamente 16 mol de ácido siálico (**5a**), dependiendo de la cantidad de enlazador usada en la reacción.

Derivatización de polisacárido MenC con hidrazida-TFA de ácido N-β-maleimidopropiónico (BMPH)

- 5 Los grupos carboxilo del ácido siálico del serogrupo C de polisacárido meningocócico **3** se hicieron reaccionar con los grupos hidrazida en el enlazador BMPH para inducir restos maleimido en la cadena de sacárido. Para realizar la reacción, el polisacárido **3** se solubilizó en MES 0,1 M pH 4,56 a una concentración final de 2 mg/ml; después se añadió EDAC (20 % en moles) y la reacción se mantuvo en oscuridad mientras se agitaba suavemente. Después de 10 minutos se añadió BMPH (46 % en moles) a la mezcla de reacción y la reacción se llevó a cabo a t.a. durante 20 horas en agitación suave. Finalmente el polisacárido derivatizado se purificó por filtración de flujo tangencial con membrana de corte de 30 kDa (Sartorius) y el polisacárido derivatizado se recuperó en el retenido.

La cantidad de grupos maleimido en la cadena de sacárido se estimó por espectro de RMN ¹H, estableciendo que introdujeron 1 mol de resto maleimido por aproximadamente 17 mol de ácido siálico.

Oxidación de serogrupos X e Y de polisacáridos meningocócicos

- 15 El ácido siálico del polisacárido MenW **10** y MenY **11** se oxidó para introducir un grupo aldehído capaz de reaccionar con un grupo amino de un péptido por reacción de aminación reductora. Ambos polisacáridos se solubilizaron en NaPi 10 mM a pH 7 a una concentración de 10 mg/ml. Se añadió NaIO₄ 0,1 M a una cantidad igual al 30 % en moles para obtener una oxidación del 30 %. La reacción se mantuvo en oscuridad mientras se agitaba a t.a. durante 20 horas. Después de este tiempo los polisacáridos **10a** y **11a** se purificaron por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una membrana de corte de 30 kDa. El grado de oxidación de compuestos puros se estimó por espectros de RMN ¹H, mostrando el 30 % de oxidación, de acuerdo con la diana deseada.

Preparación de conjugados

Síntesis de conjugados oligoMenC-péptido (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g)

- 25 Las reacciones de conjugación entre el oligosacárido **1b** y los péptidos sintéticos funcionaron apropiadamente explotando la reactividad entre el resto maleimido en el sacárido y el grupo tiol en los péptidos (Tabla 1). Las conjugaciones se realizaron con una relación mol de péptido: mol maleimido en la cadena de sacáridos de 3:1, en tampón PBS pH 7 (3 mg/ml en términos de péptido) y se incubó durante toda la noche a t.a. en agitación suave. Los tres conjugados se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna pre-empaquetada Superdex Peptide para retirar el péptido libre seguido de la precipitación con sulfato amónico para retirar el sacárido libre.

Síntesis de conjugados poliMenC_{KMUH}-péptido (4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g)

- 35 Las reacciones de conjugación entre el polisacárido **3a** y los péptidos sintéticos funcionaron apropiadamente explotando la reactividad entre el resto maleimido en el sacárido y el grupo tiol en los péptidos (Tabla 1). Las conjugaciones se realizaron con una relación mol de péptido: mol maleimido en la cadena de sacáridos de 3:1, en tampón PBS pH 7 (3 mg/ml en términos de péptido) y se incubó durante toda la noche a t.a. en agitación suave. Todos los conjugados se purificaron por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una membrana de corte de 30 kDa.

Síntesis de conjugados poZiMenC_{KMUH}-péptido (6a, 6b, 6c, 6d, 6e)

- 40 Las reacciones de conjugación entre el polisacárido **5a** y los péptidos sintéticos (Tabla 5) se realizaron como se informa anteriormente para el polisacárido **3a**. Todos los conjugados se purificaron por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una membrana de corte de 30 kDa.

Síntesis de conjugados poZiMenC_{BMPH}-péptido (8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g)

- 45 Las reacciones de conjugación entre el polisacárido **7a** y los péptidos sintéticos (Tabla 5) se realizaron como se informa anteriormente para el polisacárido **3a**. Todos los conjugados se purificaron por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una membrana de corte de 30 kDa, excepto los conjugados **8f** y **8g**, con péptidos VP1 C y N terminales, que se purificaron por cromatografía de exclusión con tamaño usando una columna pre-empaquetada Superdex Peptide.

Síntesis de conjugados poliMenC_{BMPH}-Mezcla de péptidos Met6+Fba+Hpw1 (9)

- 50 La reacción de conjugación se llevó a cabo usando una mezcla preparada de los péptidos y añadiendo esta mezcla al polisacárido **7a**. Los presentes inventores llevaron a cabo la reacción con una relación péptido Met6 en moles: péptido Hpw1 en moles: péptido Fba en moles: maleimido en moles en la cadena de sacárido de 1:1:1:1. La reacción se llevó a cabo en tampón PBS pH 7 (3 mg/ml en términos de péptido) y se incubó durante toda la noche a t.a. en agitación suave. El conjugado **9** se purificó por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una

membrana de corte de 30 kDa.

Síntesis de conjugados poliMenW-Ovap y poliMenY-Ovap (12 y 13)

5 Las reacciones de conjugación para los conjugados se realizaron por aminación reductora introduciendo el grupo amino del Ovap-_{ESGK} en un resto aldehído de ambos polisacáridos oxidados. A una solución de polisacárido (**10** u **11**) 1 mg/ml en NaPi 10 mM a pH 7, se añadió cianoborohidruro sódico (30 eq.) seguido de la adición del péptido Ova (3 eq.), conjugación de tampón NaPi 60 mM NaCl 250 mM pH 7. Ambas reacciones de conjugación e incubaron a 37 °C durante 5 días. Los conjugados **12** y **13** se purificaron por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una membrana de corte de 30 kDa.

Síntesis de conjugados poZyMenC_{KMUH}-Ovap y poliMenC_{BMPH}-Ovap (14 y 15)

10 Las reacciones de conjugación se realizaron como se informa anteriormente para el polisacárido **3a**. Se usó respectivamente el polisacárido **5a** (derivatizado con un enlazador KMUH) para preparar el conjugado **14** y el polisacárido **7a** (derivatizado con un enlazador BMPH) para preparar el conjugado **15**. Ambos conjugados se purificaron por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una membrana de corte de 30 kDa.

Síntesis de conjugado poliMenC-Ovap (16)

15 Para preparar glucopéptido **16** donde el péptido Ovap-_{ESGK} se conjugó directamente a la cadena de sacárido, los presentes inventores explotaron la reacción de condensación entre un grupo amino libre del péptido y los grupos carboxilo del polisacárido **3** para insertar un enlace amida. A una solución de sacárido 3 mg/ml en MES 30 mM pH 6, se añadió una mezcla de EDAC (3 eq.) y se añadió sulfo-NHS (3 eq.) y la reacción se llevó a cabo a t.a. en agitación suave; después de 15 minutos se añadió el péptido Ova (3 eq.) a la mezcla de reacción. La mezcla se mantuvo a t.a. durante toda la noche en agitación suave. El conjugado **16** se purificó por ultrafiltración con un sistema Vivaspina (Sartorius) usando una membrana de corte de 30 kDa.

Procedimientos analíticos

Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-Page)

25 Se realizó SDS-Page usando geles de poliacrilamida pre-fundidos (NuPAGE®Invitrogen) 4-12 % Bis-Tris. Las ejecuciones electroforéticas se realizaron en tampón que corre MES SDS (NuPAGE®Invitrogen) cargando 2,5-5 µg de péptido de cada muestra, usando la cámara electroforética con un voltaje de 150 V durante aproximadamente 40 minutos. Las muestras se prepararon añadiendo 3 µl de tampón de muestra NuPAGE® LDS. Después de la electroforesis, el gel se lavó en H₂O tres veces, después el gel se fijó durante 30 minutos en una solución de MeOH al 50 % y ácido acético al 10 %. Después de fijar, el gel se lavó durante 3 veces en agua y finalmente se tiñó con tinte coomassie.

Análisis colorimétricos

Los contenidos peptídicos de los conjugados se determinaron por Micro BCA (Thermo) [Simth, P.K. y col. Anal. Biochem. 1985, 150, 76-85] o por ensayo colorimétrico de Lowry (Thermo) [Lowry, O.H. y col. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275], dependiendo del tipo de péptido usado.

35 El contenido de ácido siálico se ha determinado por ensayo colorimétrico de resorcinol [Svennerholm, L. Biochim. Biophys. Acta 1957, 24(3), 604-611].

Los grupos de aminoácidos se han determinado por ensayo colorimétrico [Habeeb, A.F. Anal Biochem 1966, 14, 328-38].

Cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SEC-HPLC)

40 La SEC-HPLC se realizó en un sistema de HPLC ULTIMATE™ 3000 (Dionex parte de Thermo Fisher Scientific) equipado con una PDA, un detector de fluorescencia RF2000 y un detector Shodex RI-101. La cromatografía se realizó en NaPi 0,02 M 0,25. M NaCl pH 7,2 en una columna analítica Superdex Peptide a un caudal de 0,05 ml/min, con un volumen de inyección de 50 µl de carga de 15-25 µg de muestra en contenido proteico. Los datos cromatográficos resultantes se procesaron usando el software CHROMELEON™ 6.7.

45 *Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC)*

La RP-HPLC se realizó en un sistema de HPLC ULTIMATE™ 3000 (Dionex parte de Thermo Fisher Scientific) equipado con una PDA, un detector de fluorescencia RF2000. La cromatografía se realizó con un gradiente de acetonitrilo en H₂O, desde el 5 % hasta el 45 % + 0,1 % de TFA en una columna analítica Júpiter C18 a un caudal de 0,1 ml/min, con un volumen de inyección de 50 µl. Los datos cromatográficos resultantes se procesaron usando el software CHROMELEON™ 6.7.

Análisis de RMN

Los experimentos de RMN ¹H se grabaron a 25 ± 0,1 °C en un espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz, equipado con un controlador de temperatura de alta precisión y que usa una sonda de ancho de banda de 5 mm (Bruker). Todas las muestras se disolvieron en 0,75 ml de óxido de deuterio (D₂O, 99,9 % de átomo D, Aldrich) y se insertaron en tubos de RMN de 5 mm (Wilmad). Para la adquisición y el procesamiento de datos, se usó la versión TopSpin del software 2.6 (Bruker).

Los espectros de RMN ¹H se recogieron a 400 MHz sobre un ancho de espectro de 10 ppm, acumulando aproximadamente 128 escaneos. El transmisor se ajustó a la frecuencia HDO que se usó como la señal de referencia (4,79 ppm). Todos los espectros se obtuvieron de manera cuantitativa usando un tiempo de reciclaje total para asegurar la recuperación completa de cada señal (5 x Tiempo de Relajación Longitudinal T1).

Formulaciones de vacuna y estudios inmunológicos*Preparación de formulaciones de glucoconjugados*

Las formulaciones de antígenos se prepararon en capuchas estériles usando instrumentación y soluciones estériles. Todas las formulaciones se hicieron usando PBS pH 7,2 como un tampón donde las vacunas se diluyeron para obtener la dosificación requerida de sacárido por ratón en un volumen total de 200 µl.

Se usó hidróxido de aluminio (AlumOH) como adyuvante y se preparó como solución 2x para mezclar 1:1 con el volumen total de PBS. Cada dosis contenía 0,36 mg de hidróxido de aluminio.

Los conjugados y las vacunas de conjugado se administraron a grupos de ocho ratones hembra Balb/c en 1 µg por dosis en contenido de sacárido.

Los ratones se inmunizaron subcutáneamente el día 1, 14 y 28. Los sangrados se realizaron el día 0 (pre inmune), el día 28 (post 2) y el día 42 (post 3). Los grupos control recibieron PBS más adyuvante. Se siguieron las directrices experimentales en animales expuestas por el Departamento de Cuidado Animal de Novartis en la conducta de todos los estudios animales.

Evaluación inmunoquímica de la respuesta

La respuesta de anticuerpos inducida por los glucoconjugados contra los polisacáridos homólogos y péptidos se midió por ensayo ELISA. Se recubrieron placas Maxisorp de noventa y seis pocillos (Nunc, Thermo Fisher Scientific) con los diferentes polisacáridos meningocócicos o péptidos añadiendo 100 µl/pocillo de una solución de polisacárido 5 µg/ml en tampón PBS a pH 8,2 o 100 µl/pocillo de una solución de péptido 10 µg/ml en tampón PBS a pH 7,2, seguido de incubación durante toda la noche (o.n.) a 4 °C. Después del recubrimiento, las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de TPBS (PBS con 0,05 % de Tween 20, pH 7,4) y se bloquearon con 100 µl/pocillo de BSA al 3 % (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, cada etapa de incubación se siguió de un triple lavado de TPBS. Los sueros, prediluidos 1:25, 1:100, 1:200 en TPBS, se transfirieron en placas recubiertas (200 µl) y después se diluyeron en serie dos veces seguido de 2 h de incubación a 37 °C. Después de tres lavados con TPBS, se añadieron 100 µl de soluciones de conjugados de fosfatos alcalinos de anticuerpo secundario (IgG anti ratón 1:10000) y las placas se incubaron 1 h a 37 °C. Después de tres lavados más con TPBS, se añadieron 100 µl/pocillo de un 1 mg/ml de p-NPP (Sigma) en un tampón di-etanolamina 0,5 M a pH 9,8. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, se leyeron las placas a 405 nm usando un lector de placas Biorad. La adquisición de datos en bruto se ha realizado por el Software Microplate Manager (Biorad). Los títulos de suero se expresaron como lo recíproco a la dilución de los sueros correspondiente al corte de OD = 1 o al corte de OD = 0,2. Cada grupo de inmunización se representó como la media geométrica (GMT) de los títulos de ratones únicos. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron usando software GraphPad Prism.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y pueden realizarse modificaciones mientras se mantengan dentro del ámbito y el espíritu de la invención.

REFERENCIAS (los contenidos de las cuales se incorporan en el presente documento completamente)

- [1] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [2] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [3] Patente de EE.UU. 6355271.
 [4] WO00/23105.
 [5] WO90/14837.
 [6] WO90/14837.
 [7] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
 [8] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

- [9] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [10] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- [11] Hariharan y col. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- 5 [12] US-2007/014805.
- [13] Suli y col. (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.
- [14] WO95/11700.
- [15] Patente de EE.UU. 6.080.725.
- [16] WO2005/097181.
- 10 [17] WO2006/113373.
- [18] Han y col. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.
- [19] US- 6630161.
- [20] US 5.057.540.
- 15 [21] WO96/33739.
- [22] WO96/11711.
- [23] WO00/07621.
- [24] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [25] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- 20 [26] Niiikura y col. (2002) Virology 293:273-280.
- [27] WO03/024481.
- [28] Gluck y col. (2002) Vaccine 20:B10-B16.
- [29] EP-A-0689454.
- [30] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- 25 [31] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- [32] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
- [33] Pajak y col. (2003) Vaccine 21:836-842.
- [34] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
- [35] WO02/26757.
- 30 [36] WO99/62923.
- [37] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [38] US 6.429.199.
- [39] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (parte 3):654-658.
- [40] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- 35 [41] WO01/95935.
- [42] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306:948-953.
- [43] WO03/035836.
- [44] WO01/22972.
- [45] Schellack y col. (2006) Vaccine 24:5461-72.
- 40 [46] WO95/17211.
- [47] WO98/42375.
- [48] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [49] Pine y col. (2002) J Control Release 85:263-270.
- [50] Tebbey y col. (2000) Vaccine 18:2723-34.
- 45 [51] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [52] WO99/40936.
- [53] WO99/44636.
- [54] Singh y col] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [55] WO99/27960.
- 50 [56] US 6.090.406.
- [57] EP-A-0626169.
- [58] WO99/52549.
- [59] WO01/21207.
- [60] WO01/21152.
- 55 [61] Andrianov y col. (1998) Biomaterials 19:109-115.
- [62] Payne y col. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.
- [63] US 4.680.338.
- [64] US 4.988.815.
- [65] WO92/15582.
- 60 [66] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [67] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [68] WO03/011223.
- [69] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [70] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- 65 [71] WO2004/060308.
- [72] WO2004/064759.

- [73] US 6.924.271.
 [74] US 5.658.731.
 [75] Patente de EE.UU. 5.011.828.
 [76] WO2004/87153.
 5 [77] US 6.605.617.
 [78] WO02/18383.
 [79] WO2004/018455.
 [80] WO03/082272.
 [81] Wong y col. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42.
 10 [82] US2005/0215517.
 [83] Dyakonova y col. (2004) Int Immunopharmacol 4(13):1615-23.
 [84] FR-2859633.
 [85] Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.
 [86] WO2004/064715.
 15 [87] De Libero y col, Nature Reviews Immunology, 2005, 5: 485-496
 [88] WO03/105769
 [89] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.
 [90] WO99/11241.
 [91] WO94/00153.
 20 [92] WO98/57659.
 [93] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
 [94] Durant y col. (2007) Infect Immun 75:1916-25.
 [95] WO02/081653.
 [96] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20a edición, ISBN: 0683306472.
 25 [97] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2a ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 [98] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30
 [99] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un conjugado de sacárido no lineal que comprende un sacárido seleccionado de un polisacárido y un oligosacárido, en la que el sacárido está enlazado a al menos dos péptidos vehículo, en la que:
 - los al menos dos péptidos vehículo comprenden al menos un epítipo de linfocito T y no tienen epítipos conformacionales de linfocitos B,
 - al menos uno de los al menos dos péptidos está enlazado internamente al sacárido y
 - al menos uno de los al menos dos péptidos comprende un epítipo de linfocito T PV1 (péptido derivado de la proteína VP1 del virus de la polio tipo 1).
2. La composición de la reivindicación 1, en la que los al menos dos péptidos comprenden un epítipo lineal de linfocito B.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que los al menos dos péptidos no comprenden un epítipo lineal de linfocito B.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que los al menos dos péptidos tienen la misma secuencia de aminoácidos.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que los al menos dos péptidos tienen diferentes secuencias de aminoácidos.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que los al menos dos péptidos están enlazados directamente al sacárido.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que los al menos dos péptidos están enlazados al sacárido a través de un enlazador.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que los enlazadores para los al menos dos péptidos son iguales.
9. La composición de la reivindicación 7, en la que los enlazadores para los al menos dos péptidos son diferentes.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que el enlazador es lineal.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en la que el enlazador es hidrazida-TFA de ácido N-kappa-maleimidoundecanoico (KMUH) o hidrazida-TFA de ácido N-β-maleimidopropiónico (BMPH).
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en la que el sacárido no está enlazado a una proteína vehículo.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el sacárido está enlazado a al menos un péptido por cinco a treintaicinco sacáridos, al menos un péptido por cinco a veinticinco sacáridos, al menos un péptido por cinco a veinte sacáridos, o al menos un péptido por siete a quince sacáridos.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el sacárido está enlazado a al menos tres péptidos, al menos cuatro péptidos, al menos cinco péptidos, al menos seis péptidos, al menos siete péptidos, al menos ocho péptidos, al menos nueve péptidos o al menos diez péptidos.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que el sacárido es un sacárido capsular.
16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que el sacárido capsular es de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Y. enterocolitica*, *V. cholerae* o *S. typhi*.
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que el sacárido es un glucano.
18. La composición de la reivindicación 17, en la que el glucano es de *C. albicans*, *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides Brasiliensis* o *Pythium insidiosum*.
19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que el sacárido comprende al menos diez sacáridos, al menos quince sacáridos, al menos veinte sacáridos, al menos veinticinco sacáridos, al menos treinta sacáridos, al menos treintaicinco sacáridos o al menos cuarenta sacáridos.
20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende además un adyuvante.

22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende además un componente adicional seleccionado de: un antígeno de *Neisseria meningitidis*, un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, un antígeno de *Streptococcus pyogenes*, un antígeno de *Moraxella catarrhalis*, un antígeno de *Bordetella pertussis*, un antígeno de *Staphylococcus aureus*, un antígeno de *Staphylococcus epidermidis*, un antígeno de *Clostridium tetani*,
 5 un antígeno de *Corynebacterium diphtheriae*, un antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), un antígeno de *Pseudomonas aeruginosa*, un antígeno de *Legionella pneumophila*, un antígeno de *Streptococcus agalactiae*, un antígeno de *Neisseria gonorrhoeae*, un antígeno de *Chlamydia trachomatis*, un antígeno de *Treponema pallidum*, un antígeno de *Haemophilus ducreyi*, un antígeno de *Enterococcus faecalis*, un antígeno de *Enterococcus faecium*, un antígeno de *Helicobacter pylori*, un antígeno de *Staphylococcus saprophyticus*, un antígeno de *Yersinia enterocolitica*, un antígeno de *E. coli*, un antígeno de *Bacillus anthracis*, un antígeno de *Yersinia pestis*, un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*, un antígeno de *Rickettsia*, un antígeno de *Listeria monocytogenes*, un antígeno de *Chlamydia pneumoniae*, un antígeno de *Vibrio cholerae*, un antígeno de *Salmonella typhi*, un antígeno de *Borrelia burgdorferi*, un antígeno de *Porphyromonas gingivalis*, un antígeno de *Shigella* y un antígeno de *Klebsiella*.
23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para su uso en un procedimiento de inducción de una respuesta inmune en un sujeto, en la que opcionalmente:
 15 (i) el sujeto es un ser humano; y/o
 (ii) la respuesta inmune reconoce el polisacárido, cuya respuesta inmune es opcionalmente más dependiente de linfocitos T que una respuesta inmune inducida por el polisacárido sin enlazar a las proteínas vehículo u otros epítomos de linfocitos T.
- 20 24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 para su uso en un procedimiento de inducción de una respuesta inmune potenciada al sacárido en un sujeto mamífero.

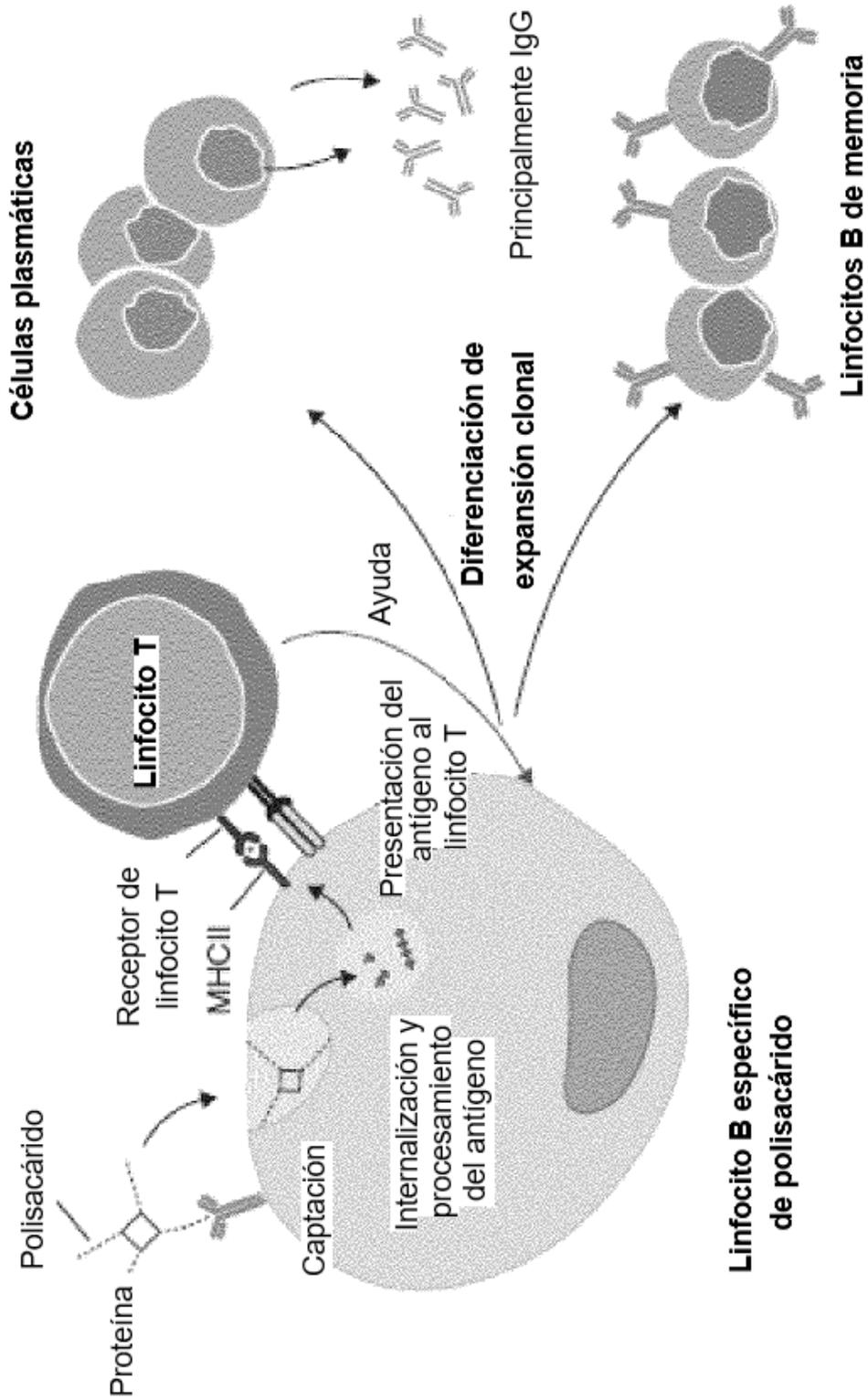


Figura 1

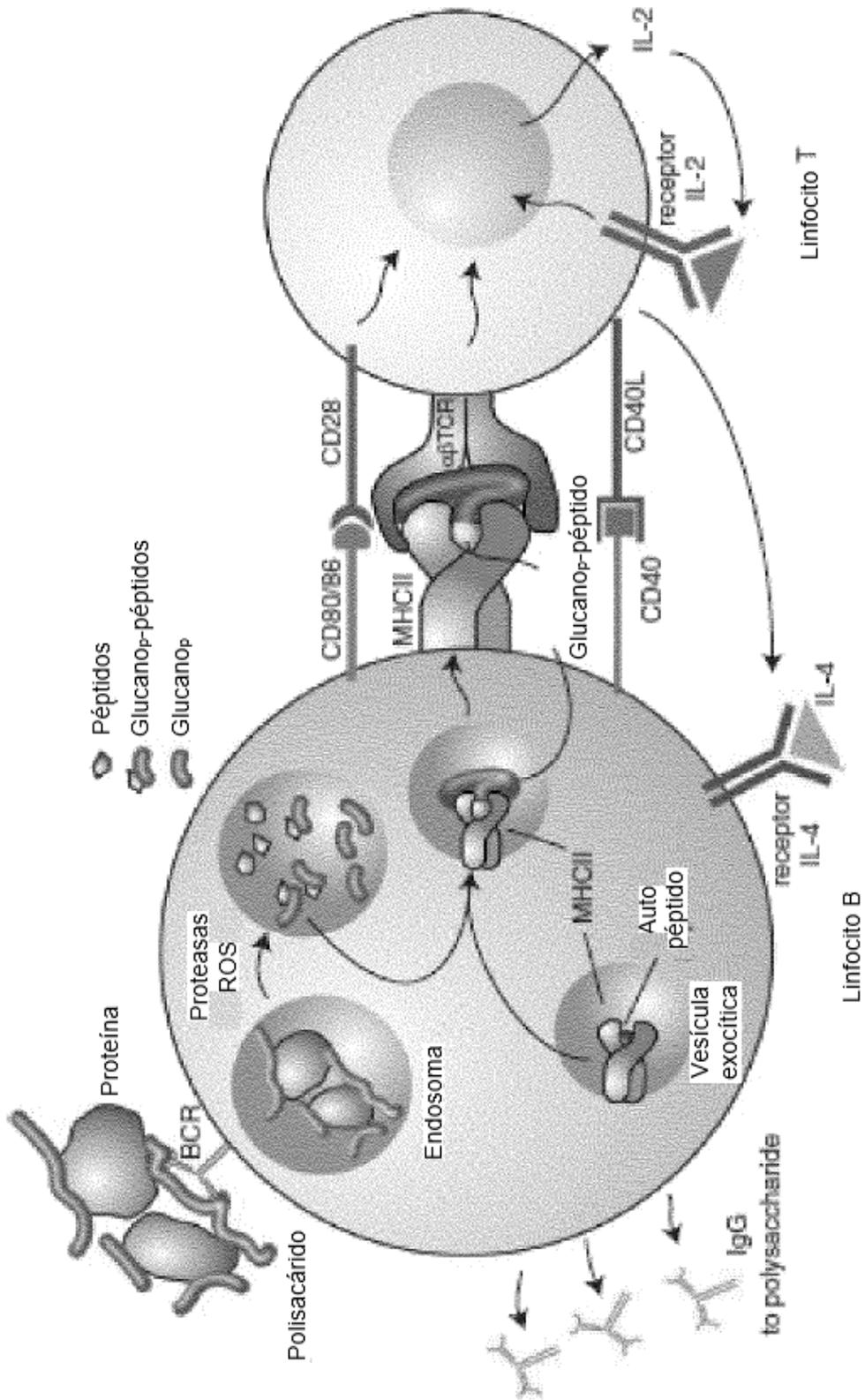


Figura 2

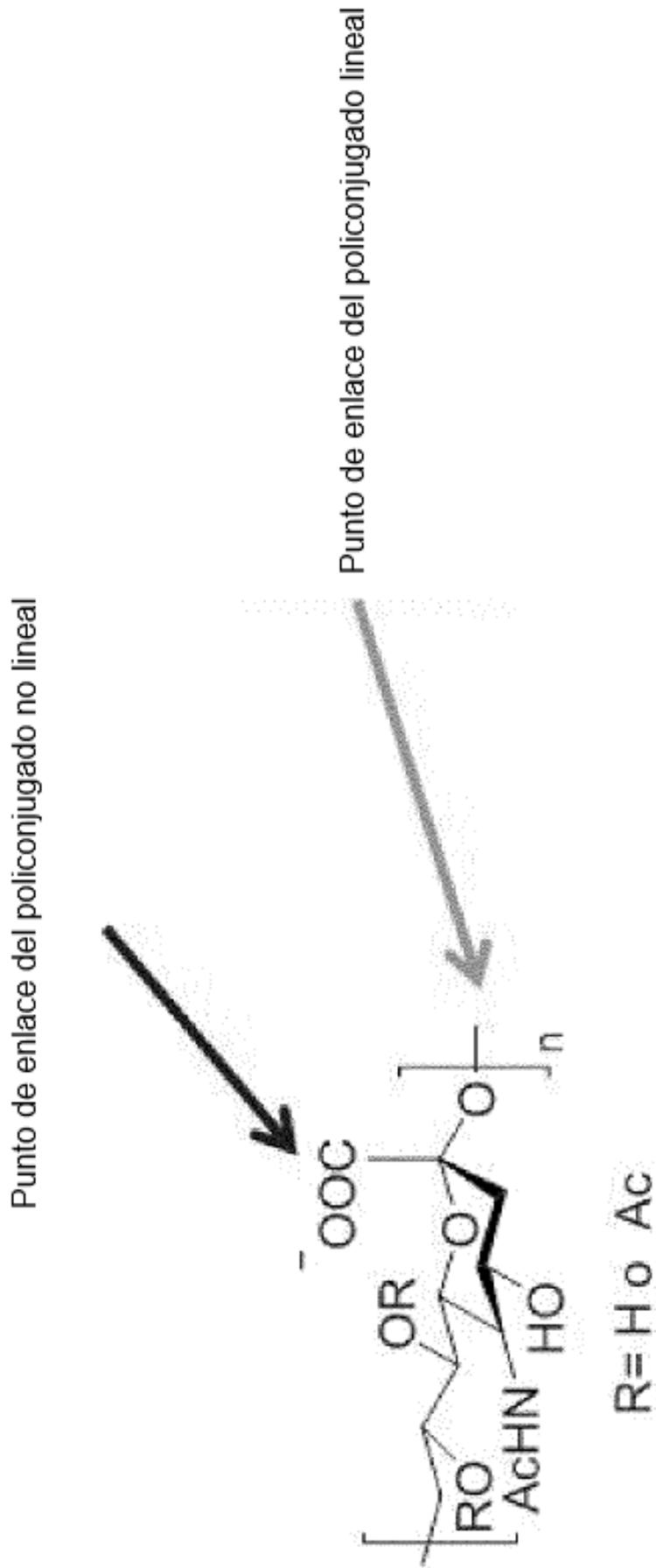
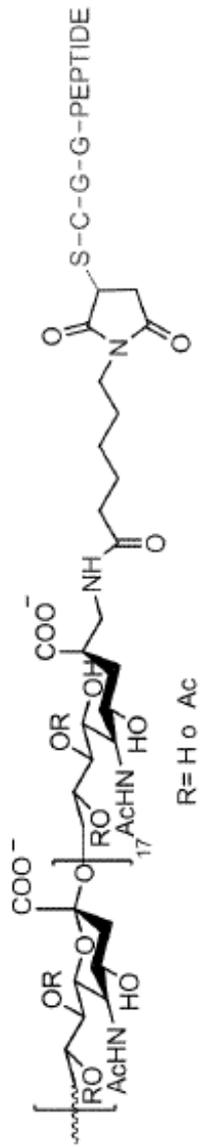


Figura 3

Conjugados OligoMenC



Conjugados PoliMenC

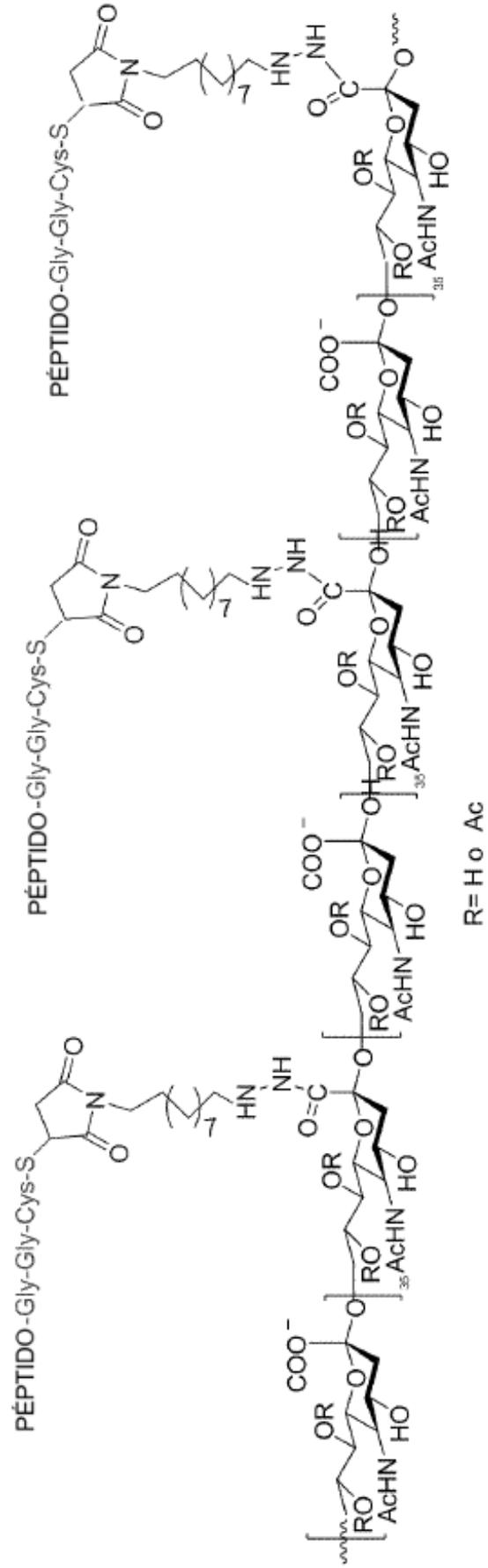


Figura 4

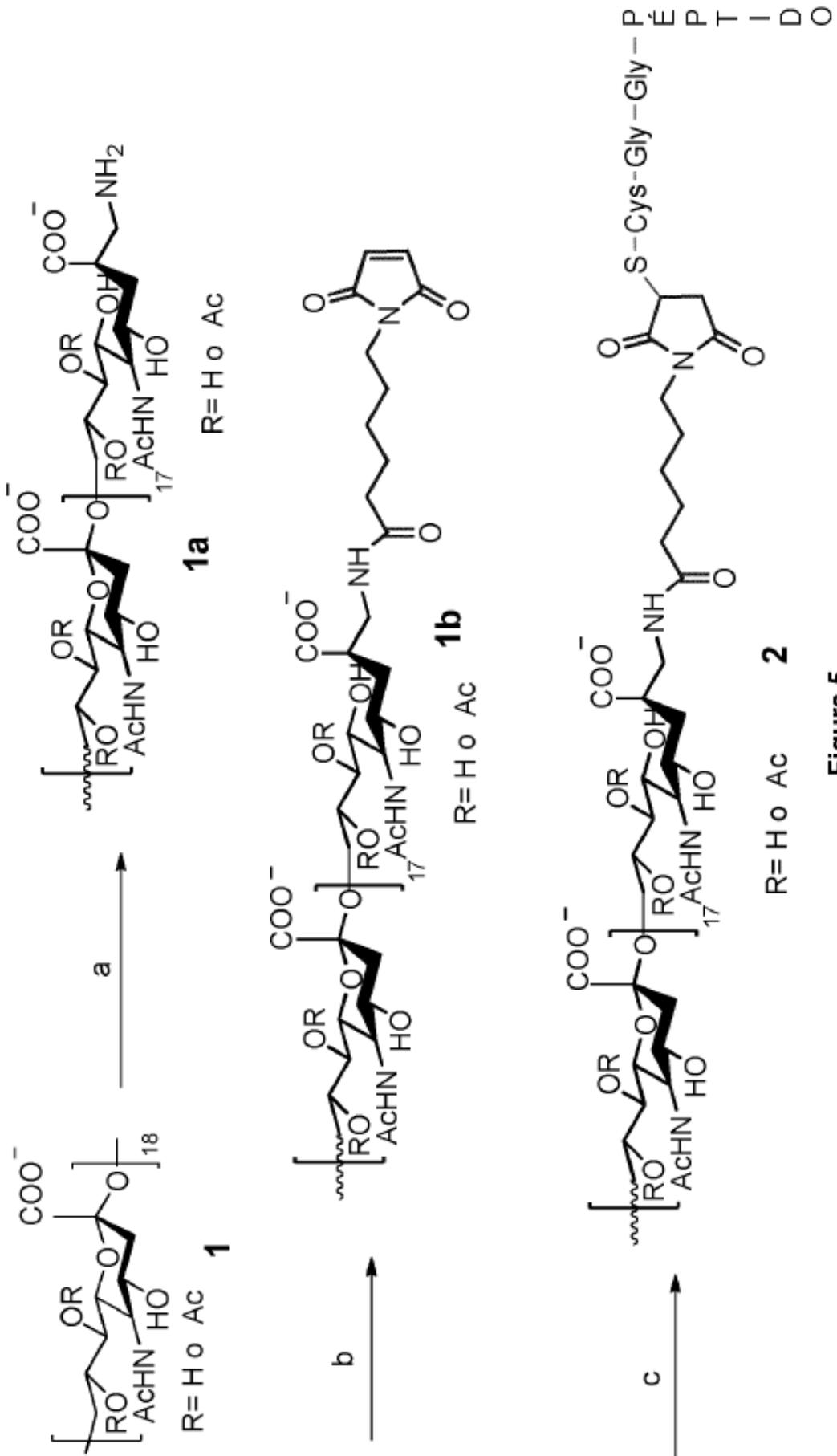


Figure 5

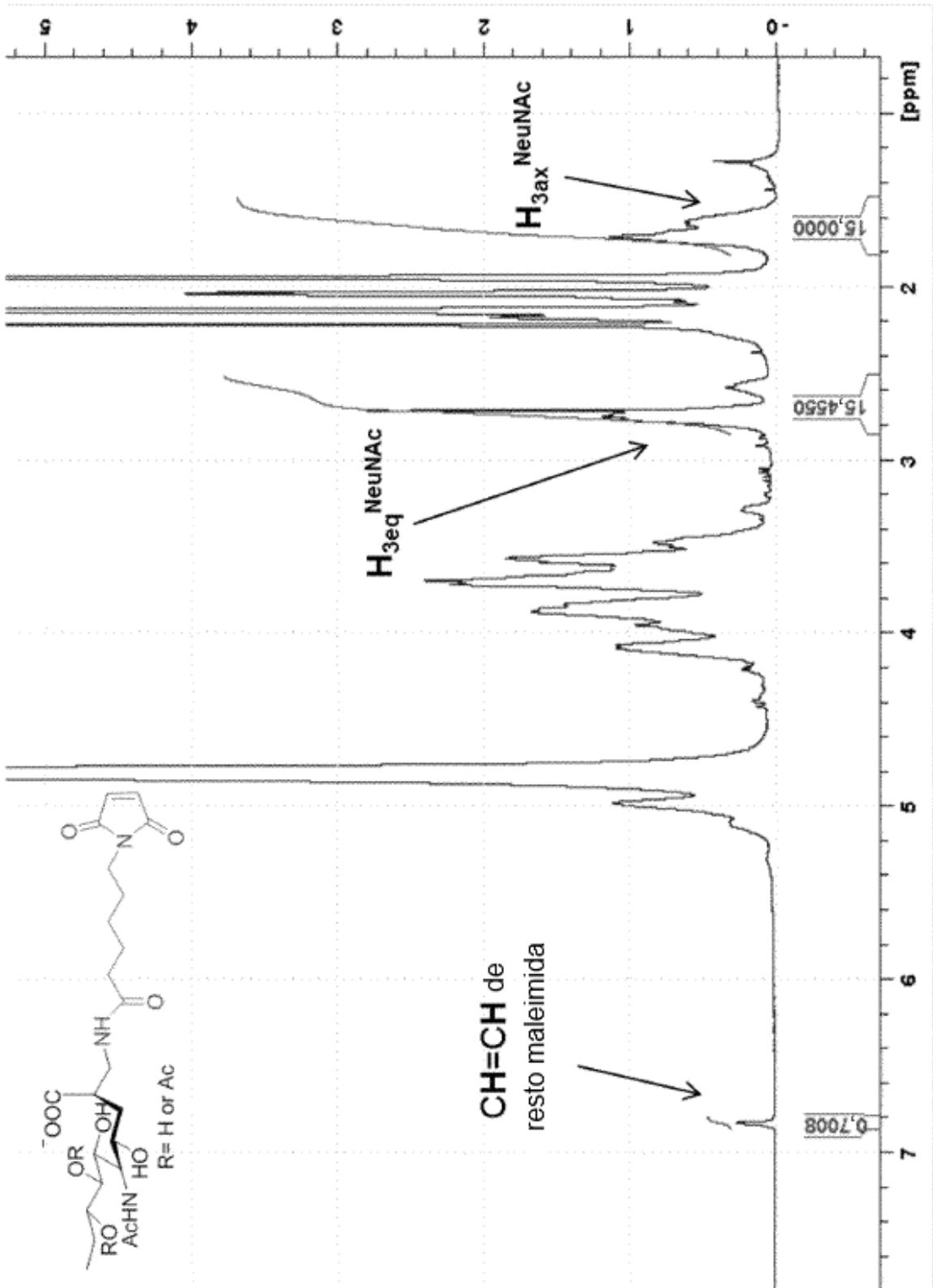


Figura 6

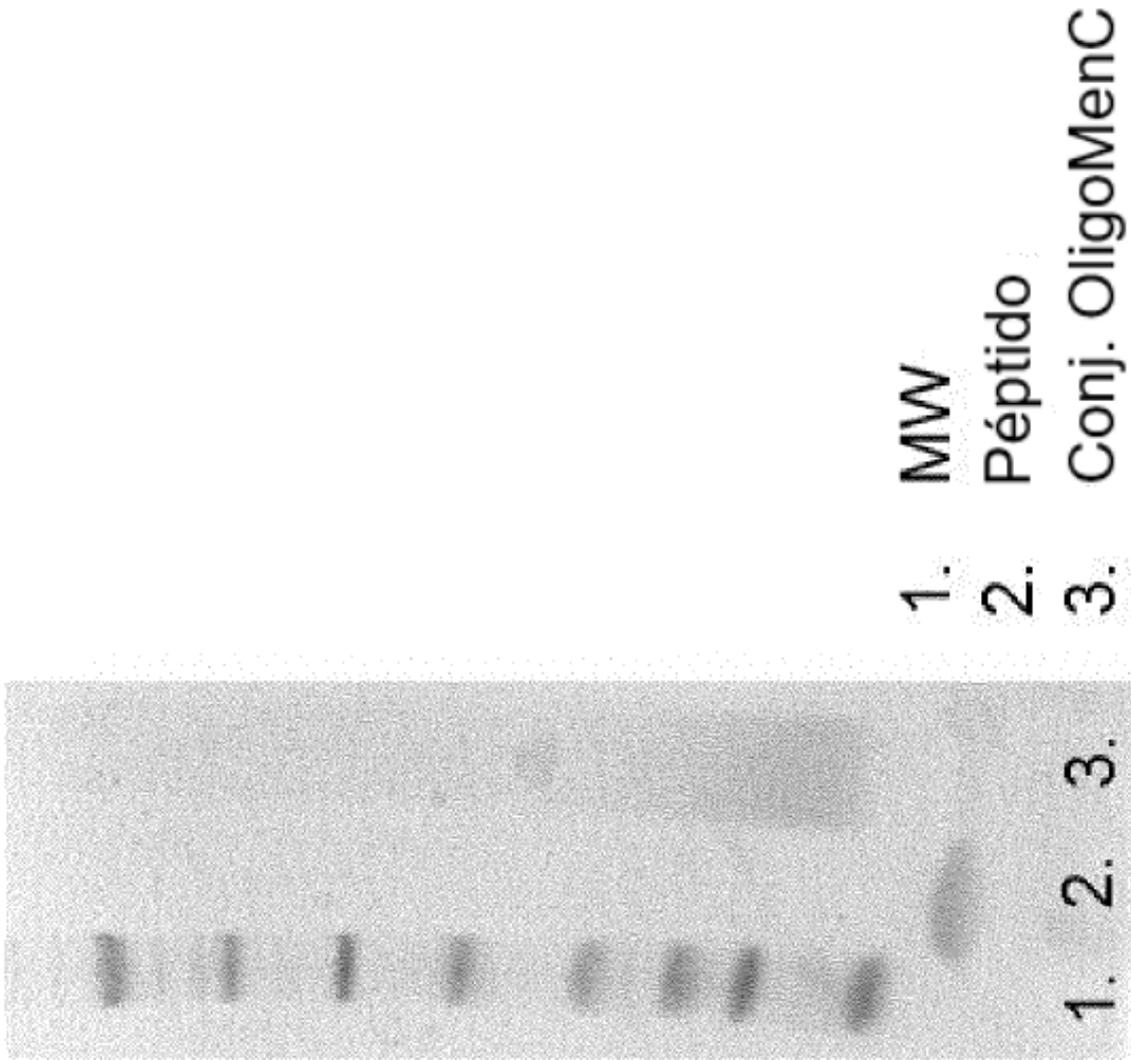


Figura 7

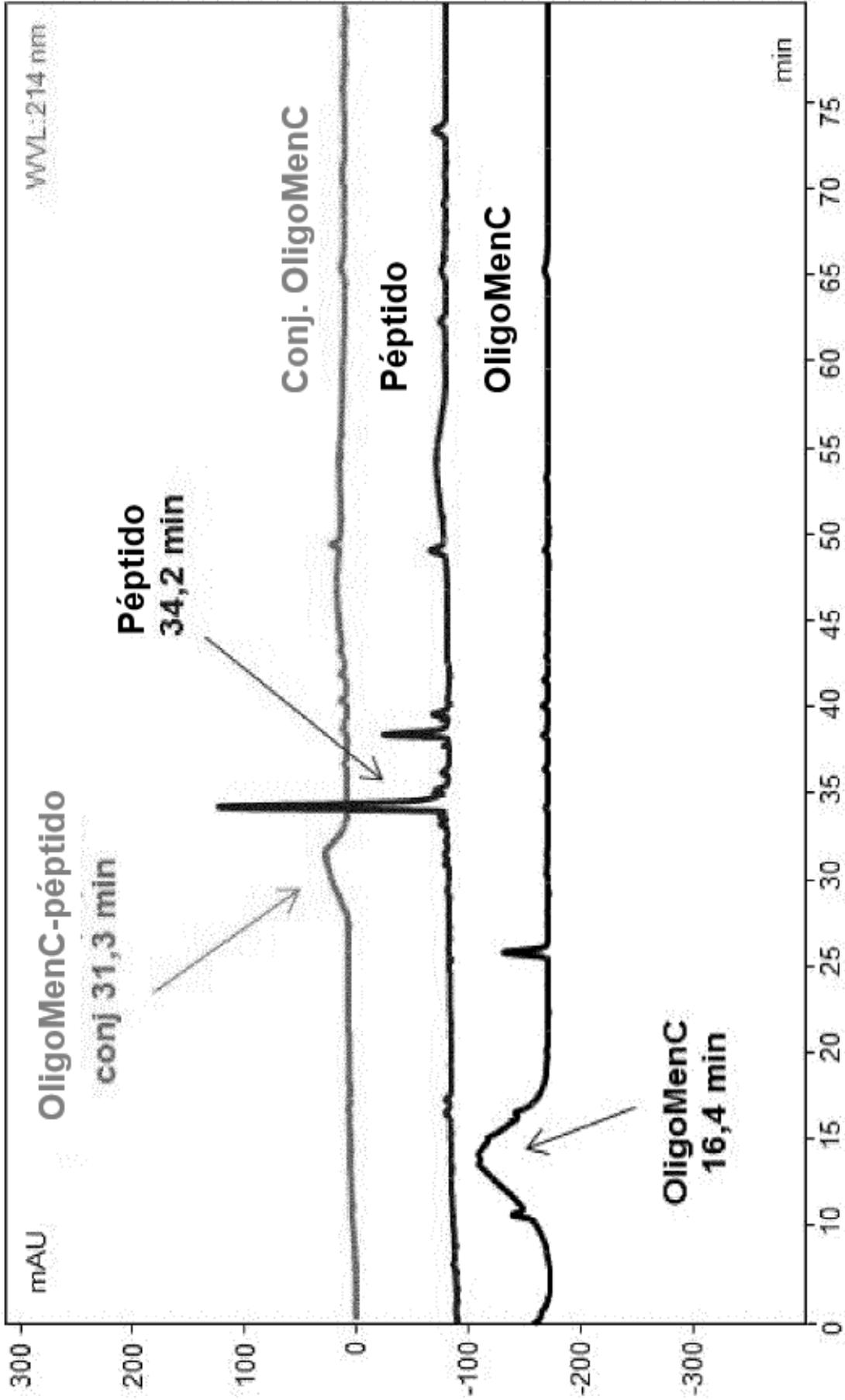


Figura 8

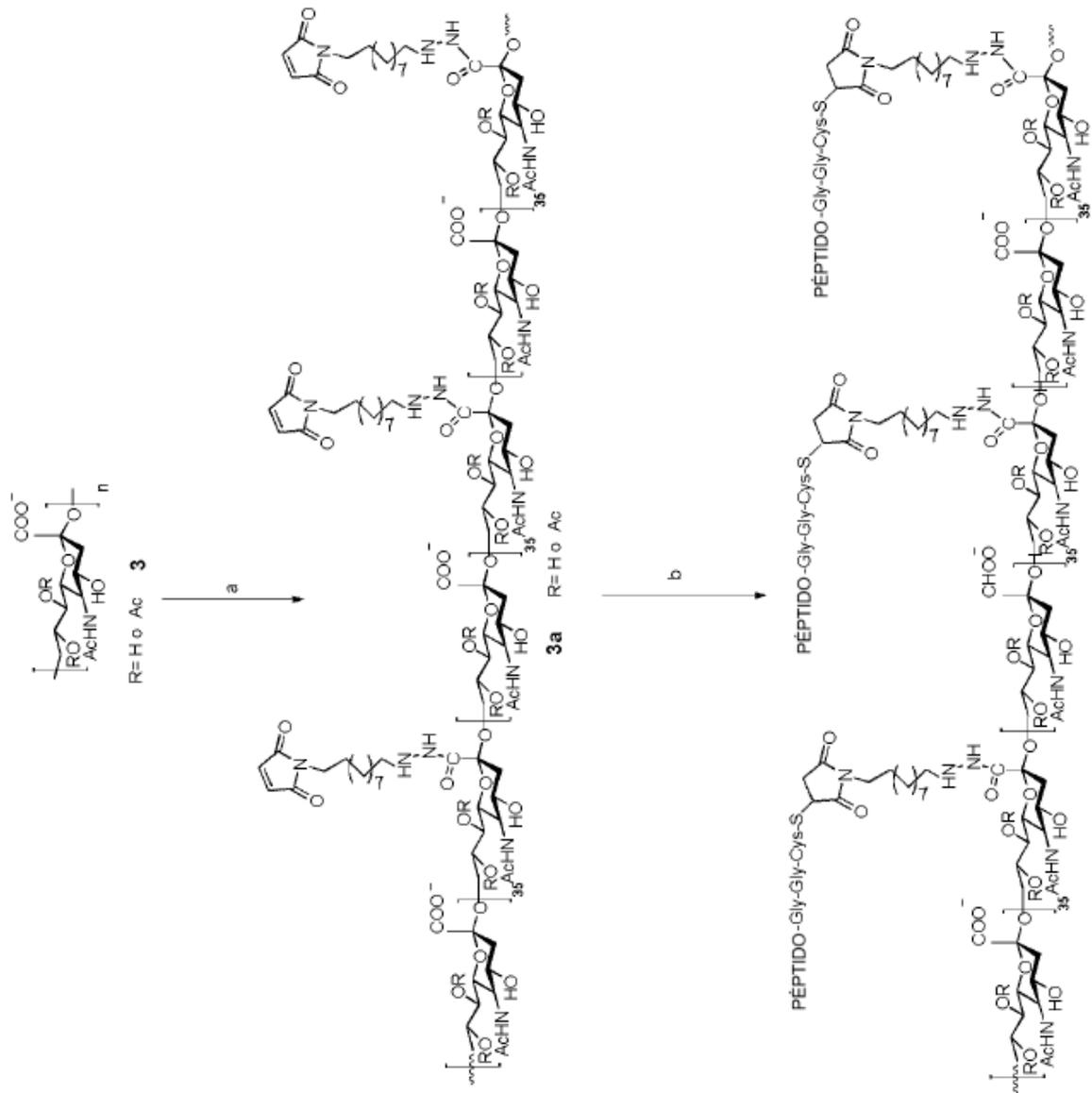


Figura 9

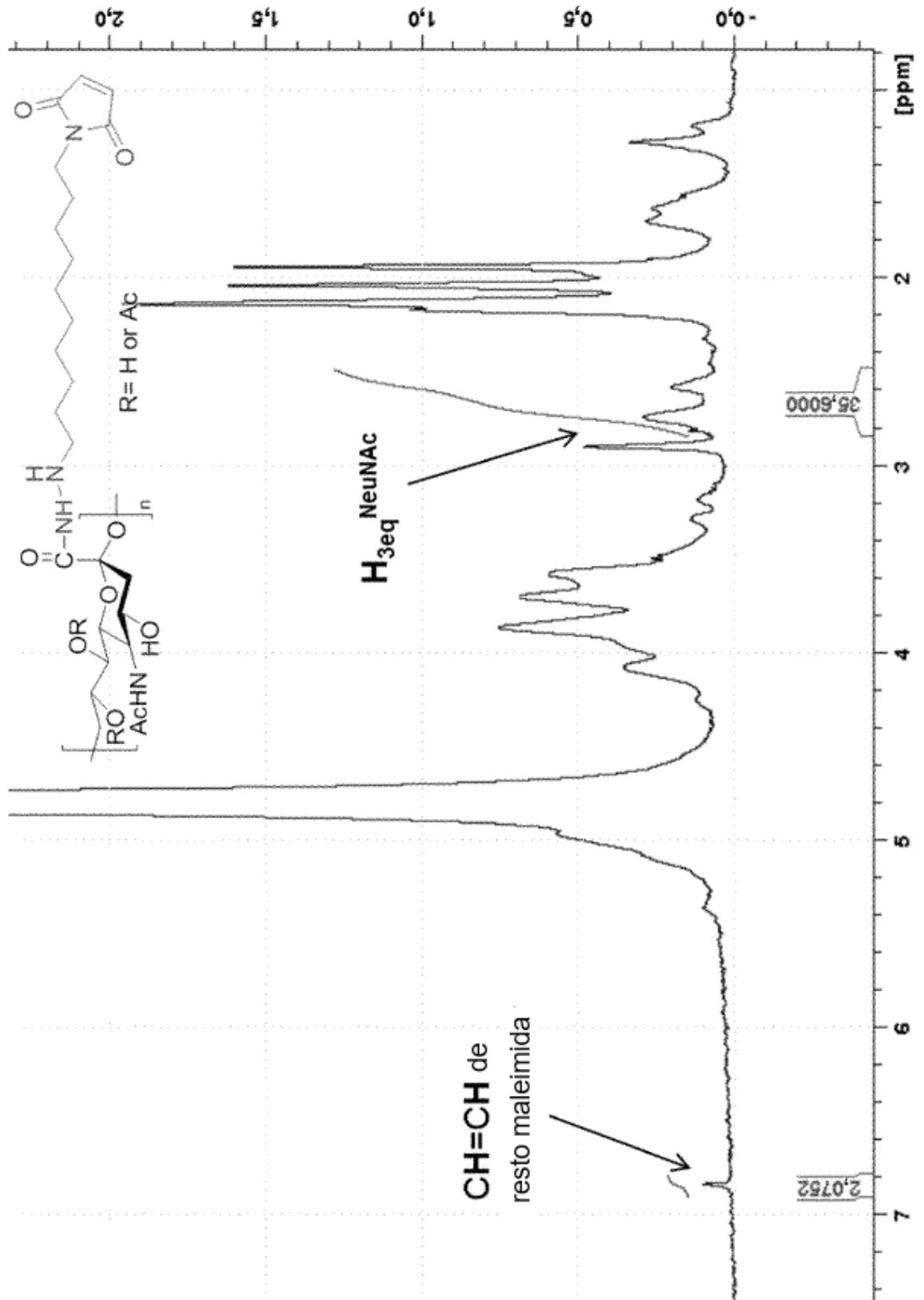


Figura 10

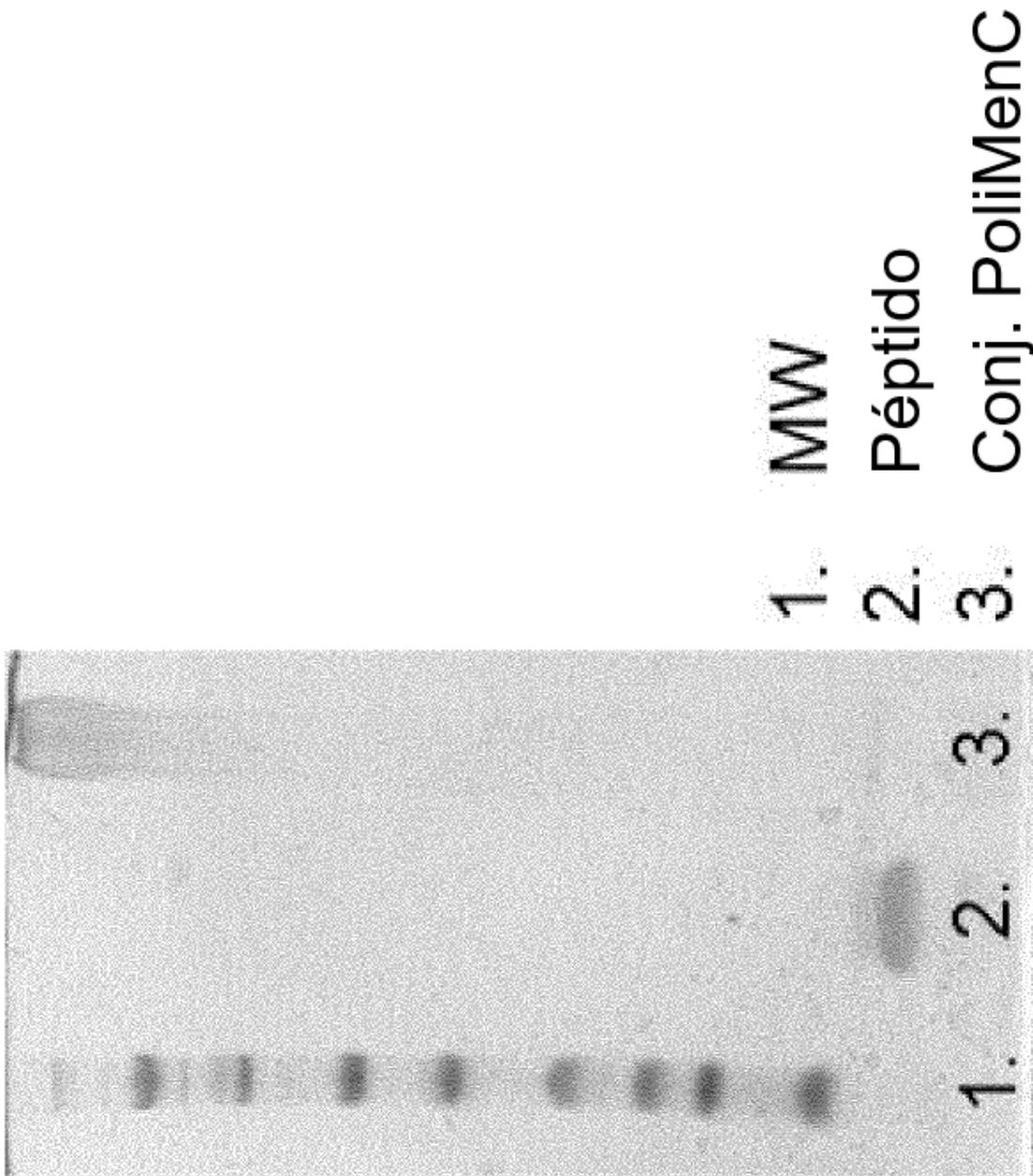


Figura 11

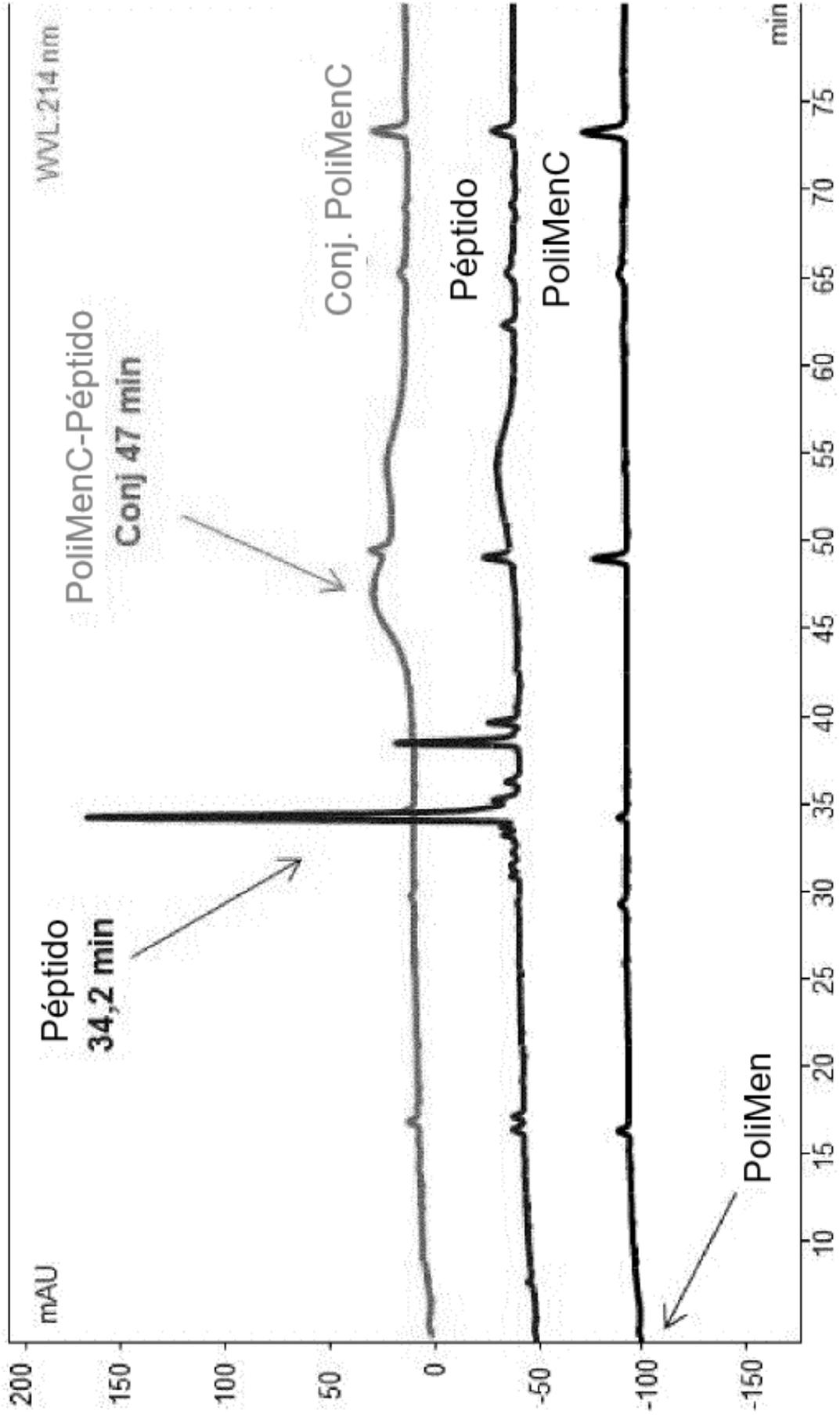


Figura 12

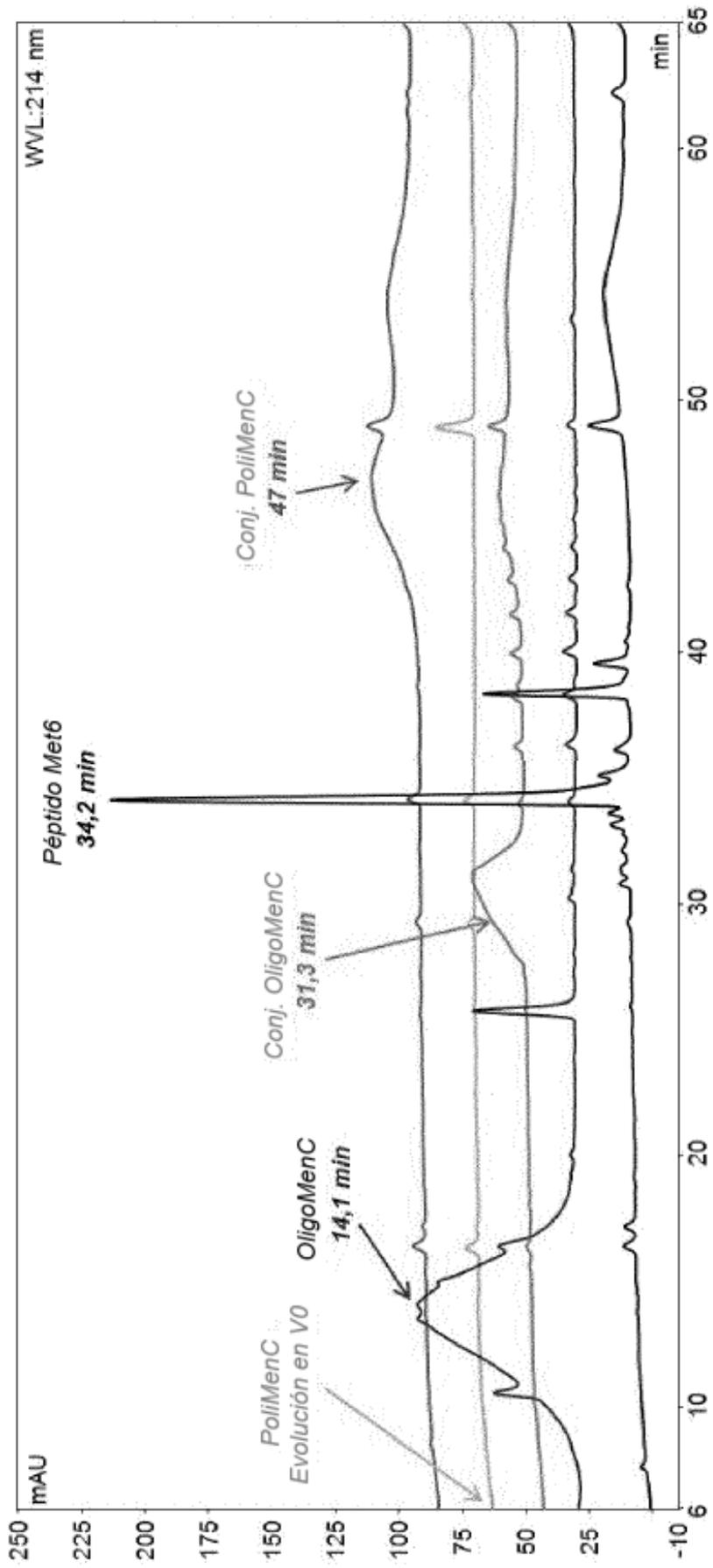


Figura 13

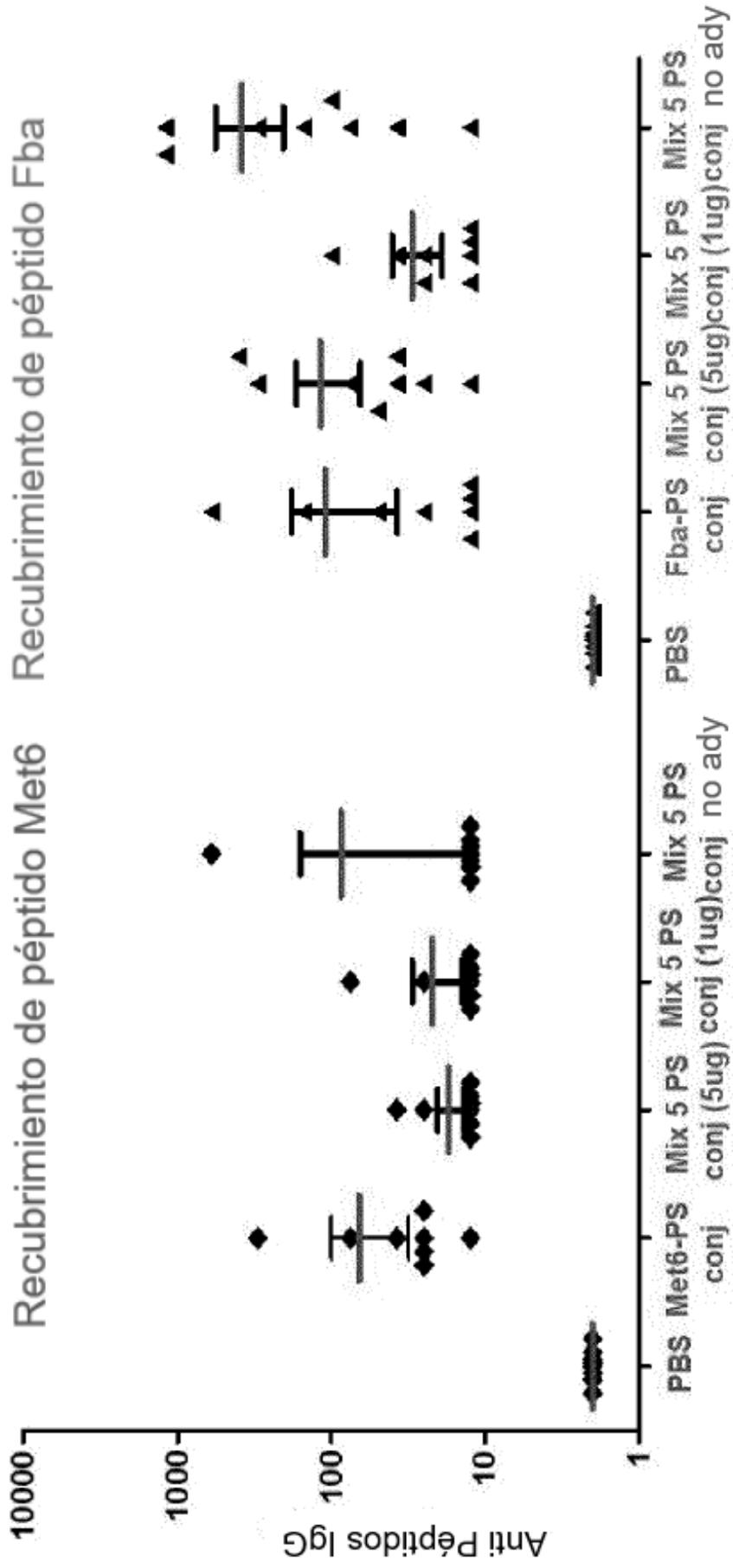


Figura 14

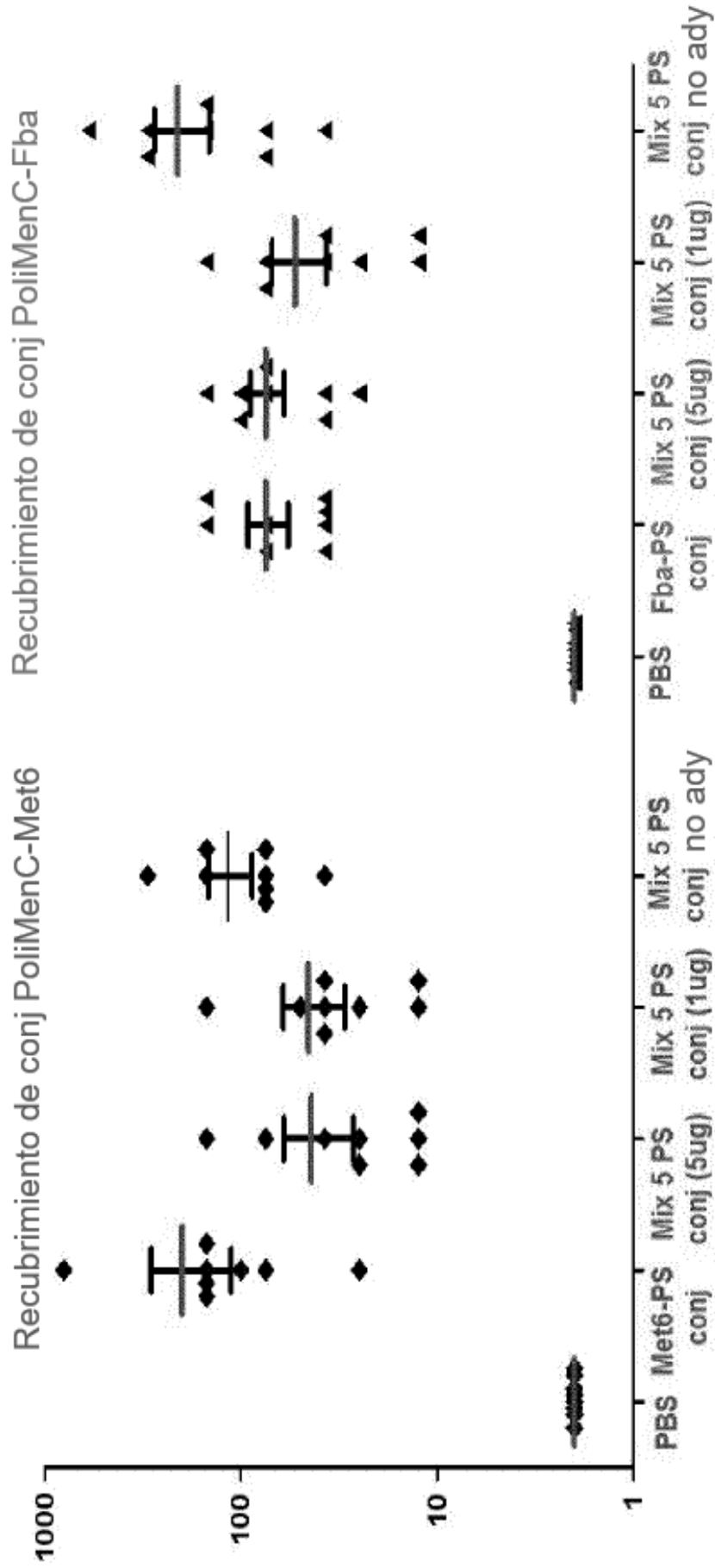


Figura 15

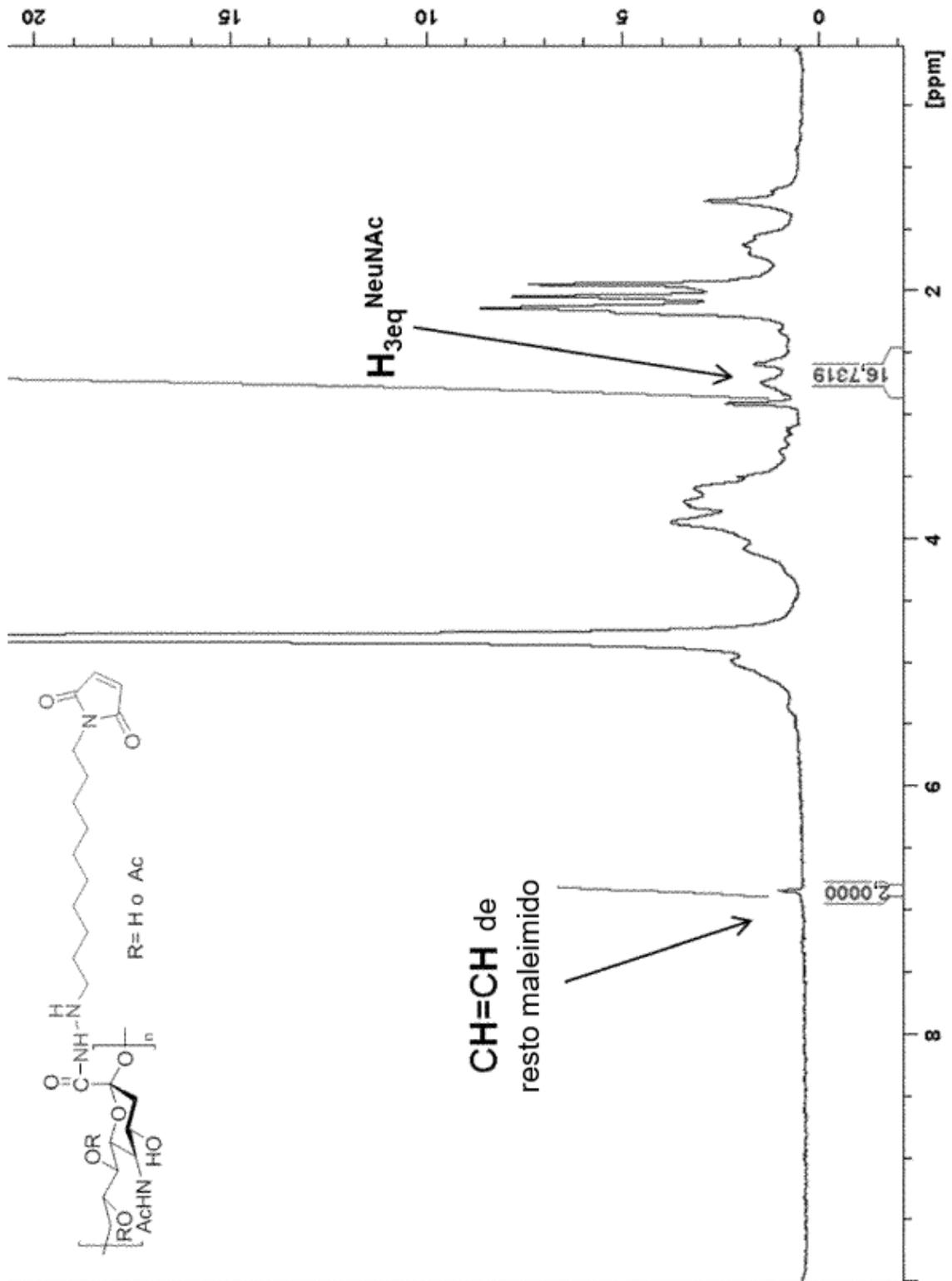


Figura 16

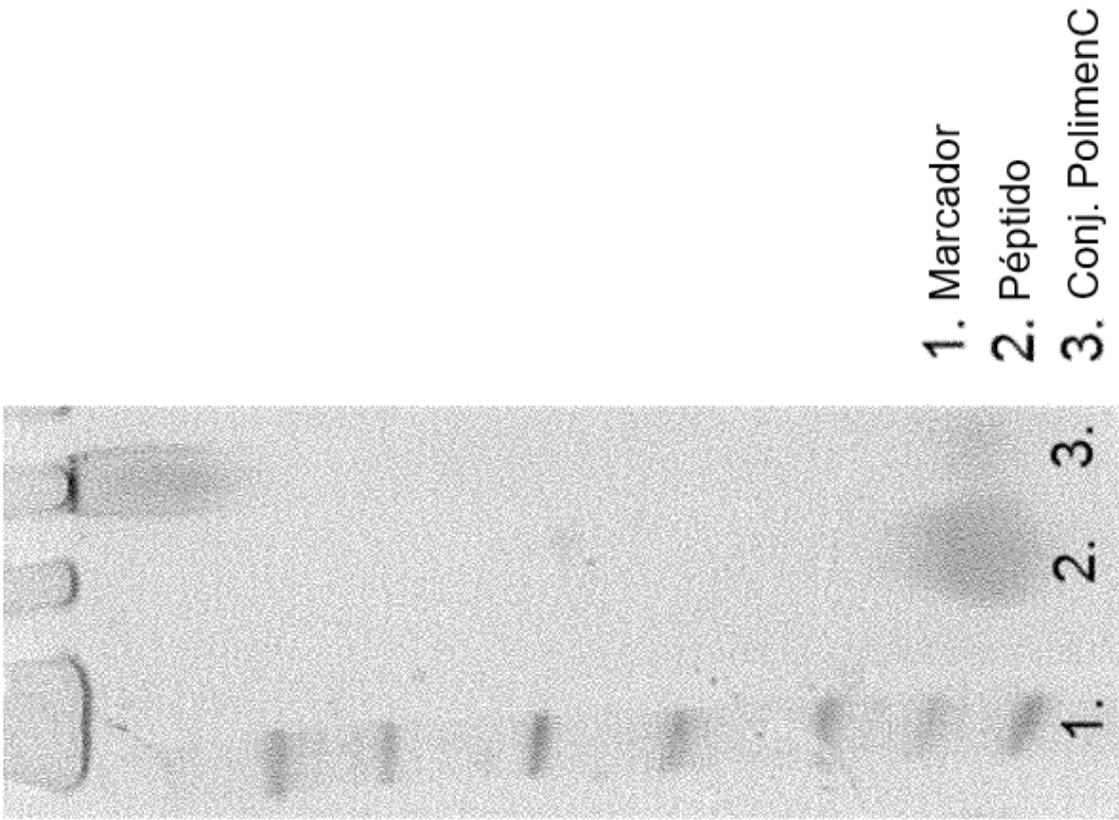


Figura 17

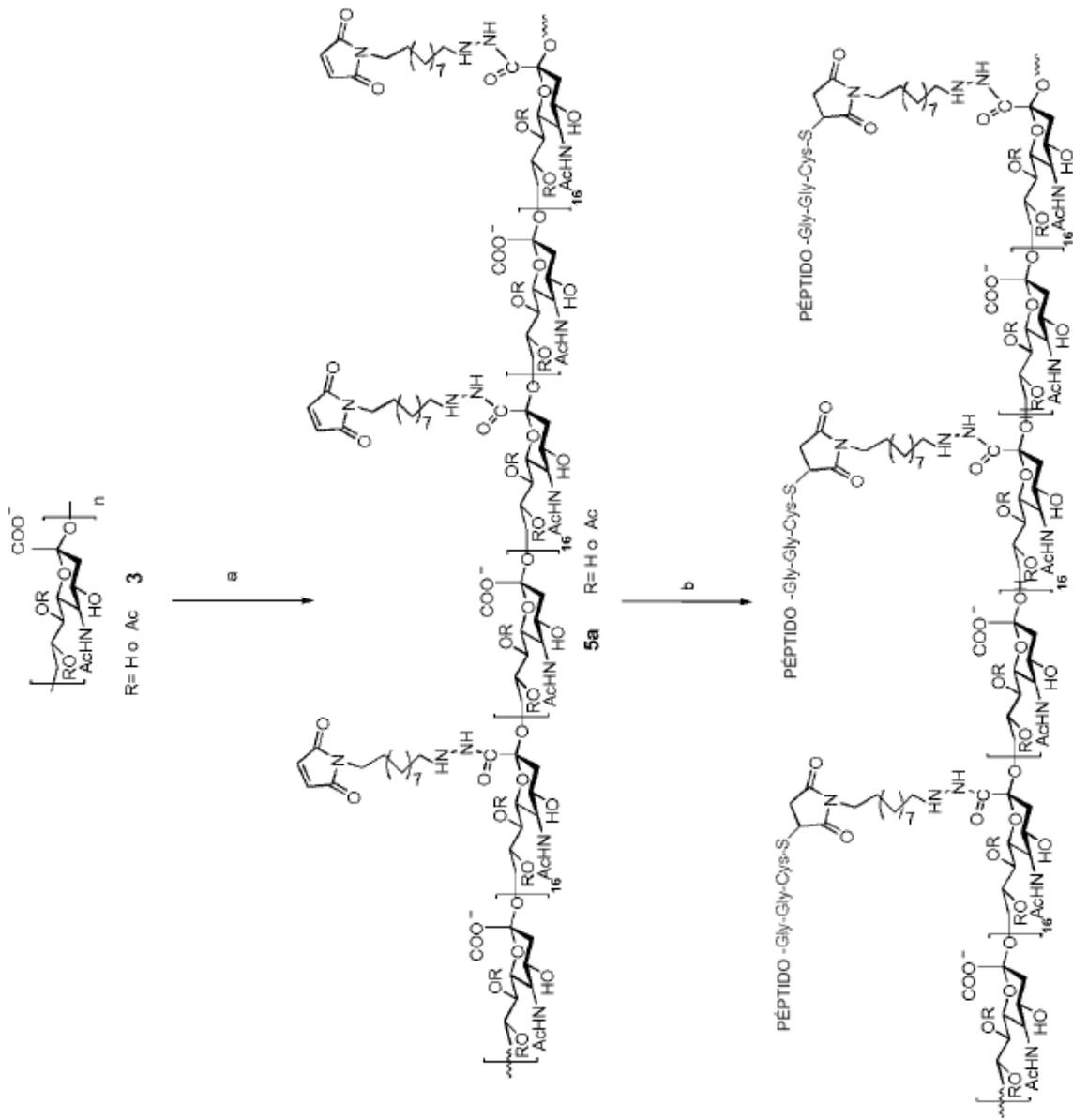


Figure 18

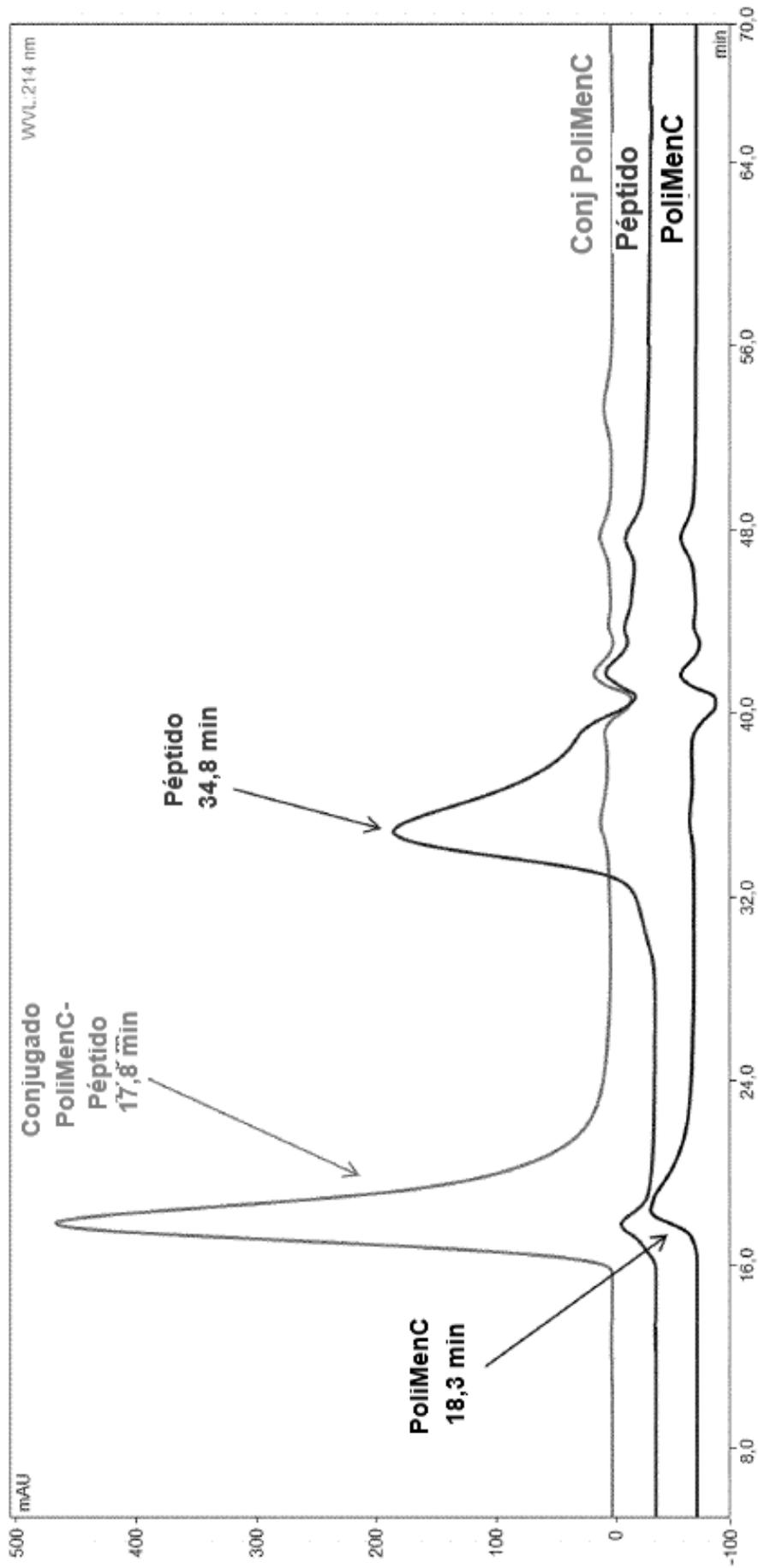


Figura 19

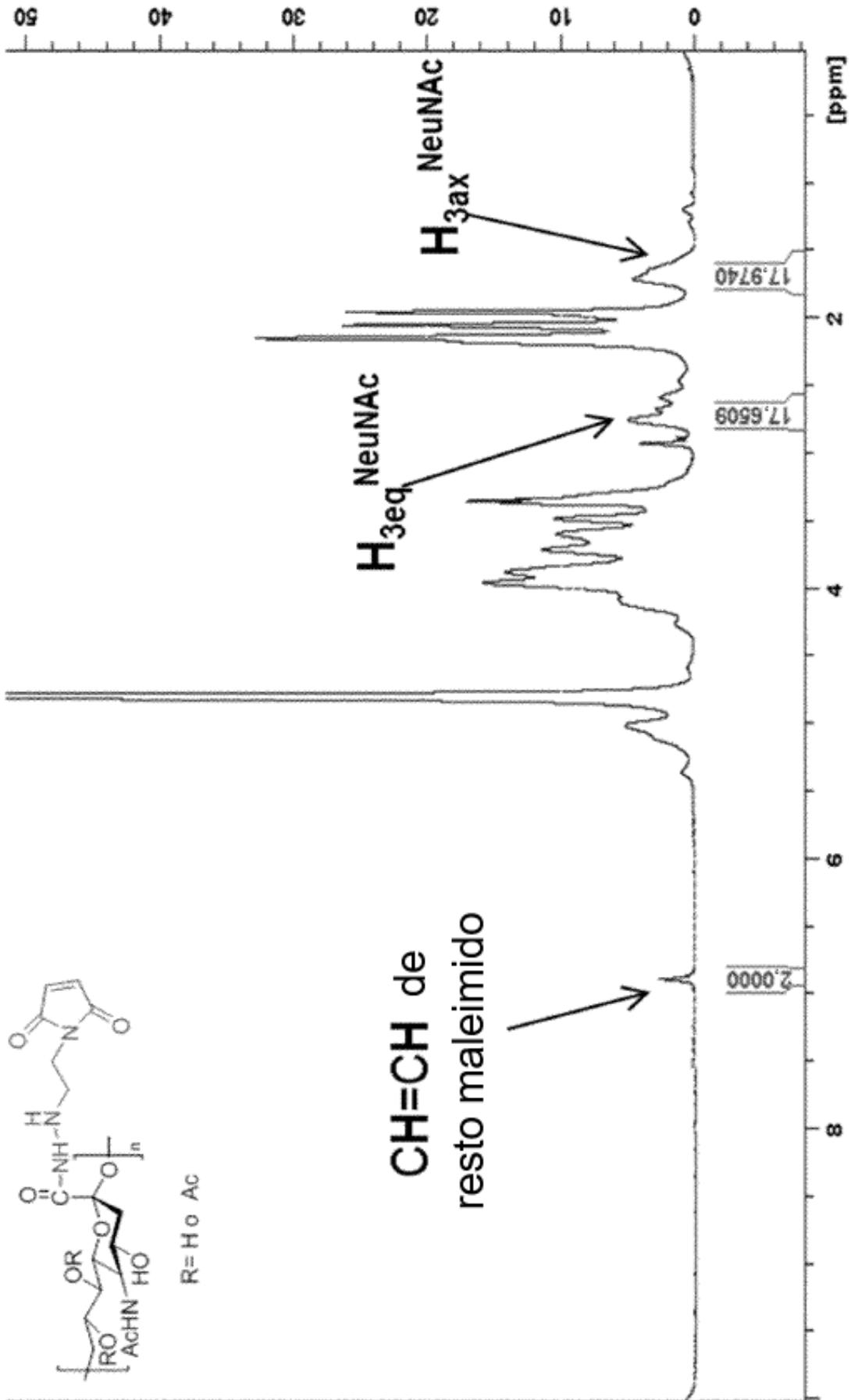
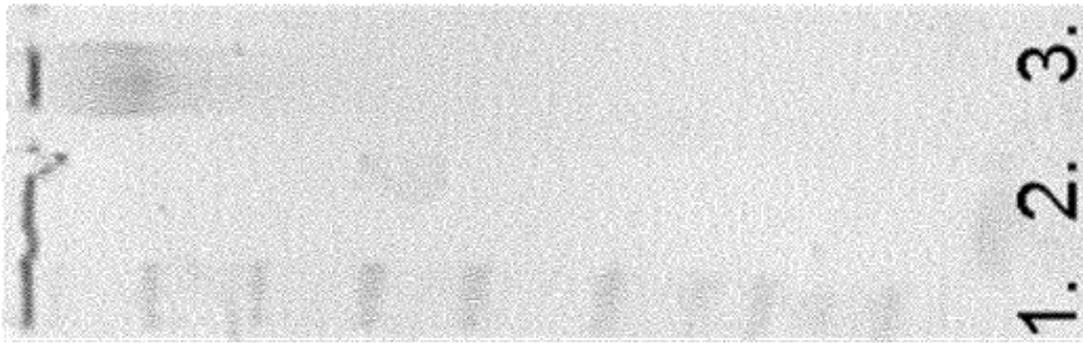


Figura 20



1. Marcador

2. Péptido

3. Conj. PolimenC

Figura 21

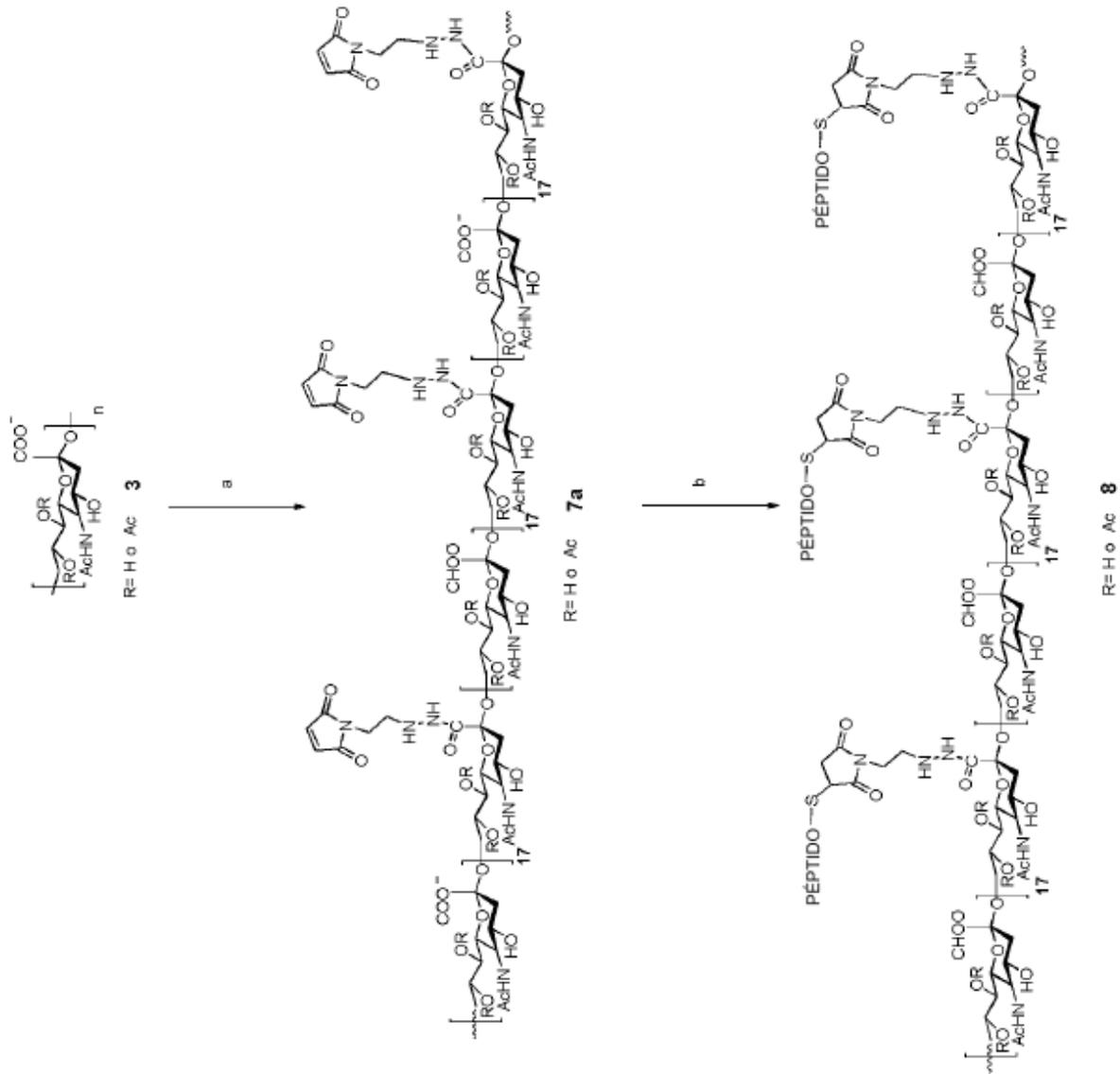


Figura 22

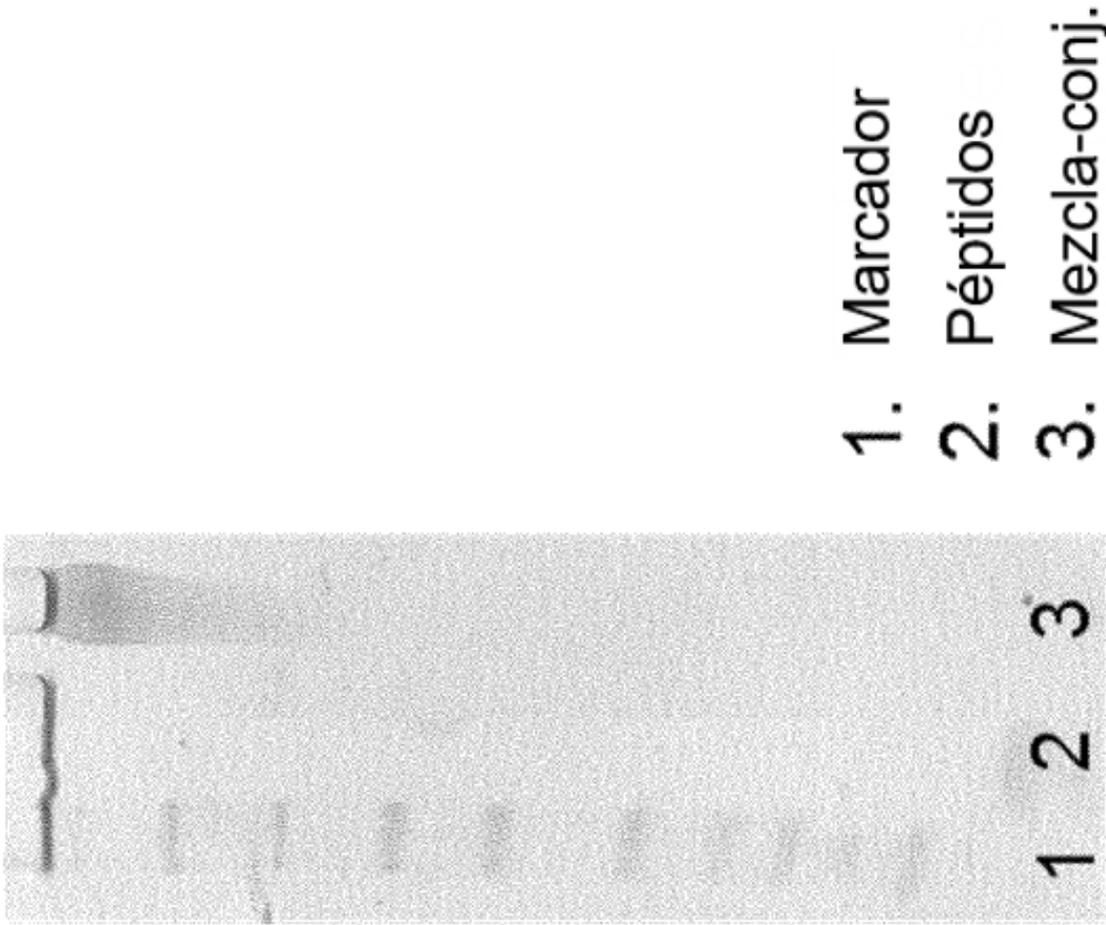


Figura 23

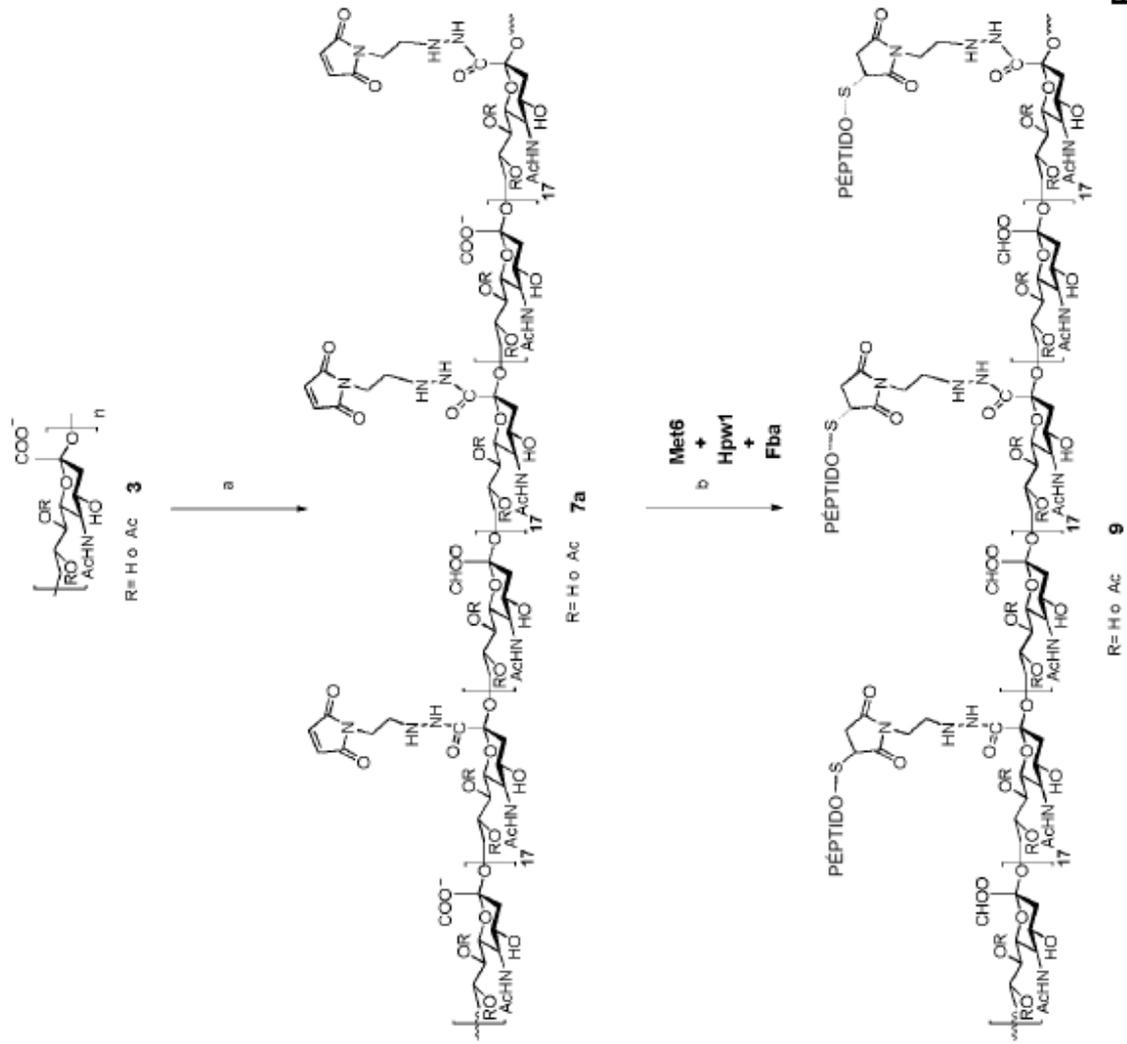


Figura 24

Esquema 5:

Fba : H-Tyr-Gly-Lys-Asp-Val-Lys-Asp-Leu-Phe-Asp-Tyr-Ala-Gln-Glu-Gly-Gly-Cys-OH

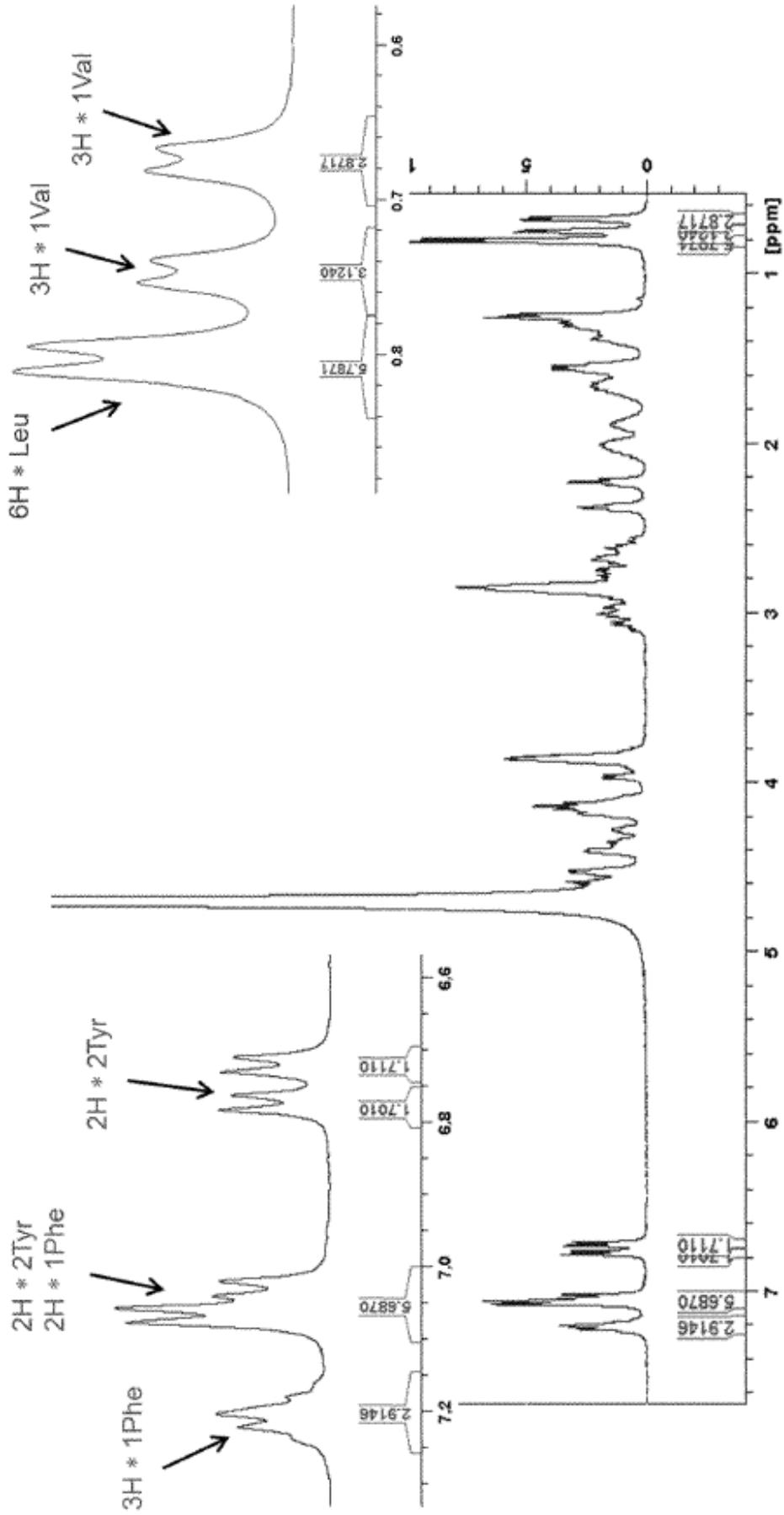


Figure 25

Met6: H-Pro-Arg-Ile-Gly-Gly-Gln-Arg-Glu-Leu-Lys-Ile-Thr-Glu-Gly-Gly-Cys-OH

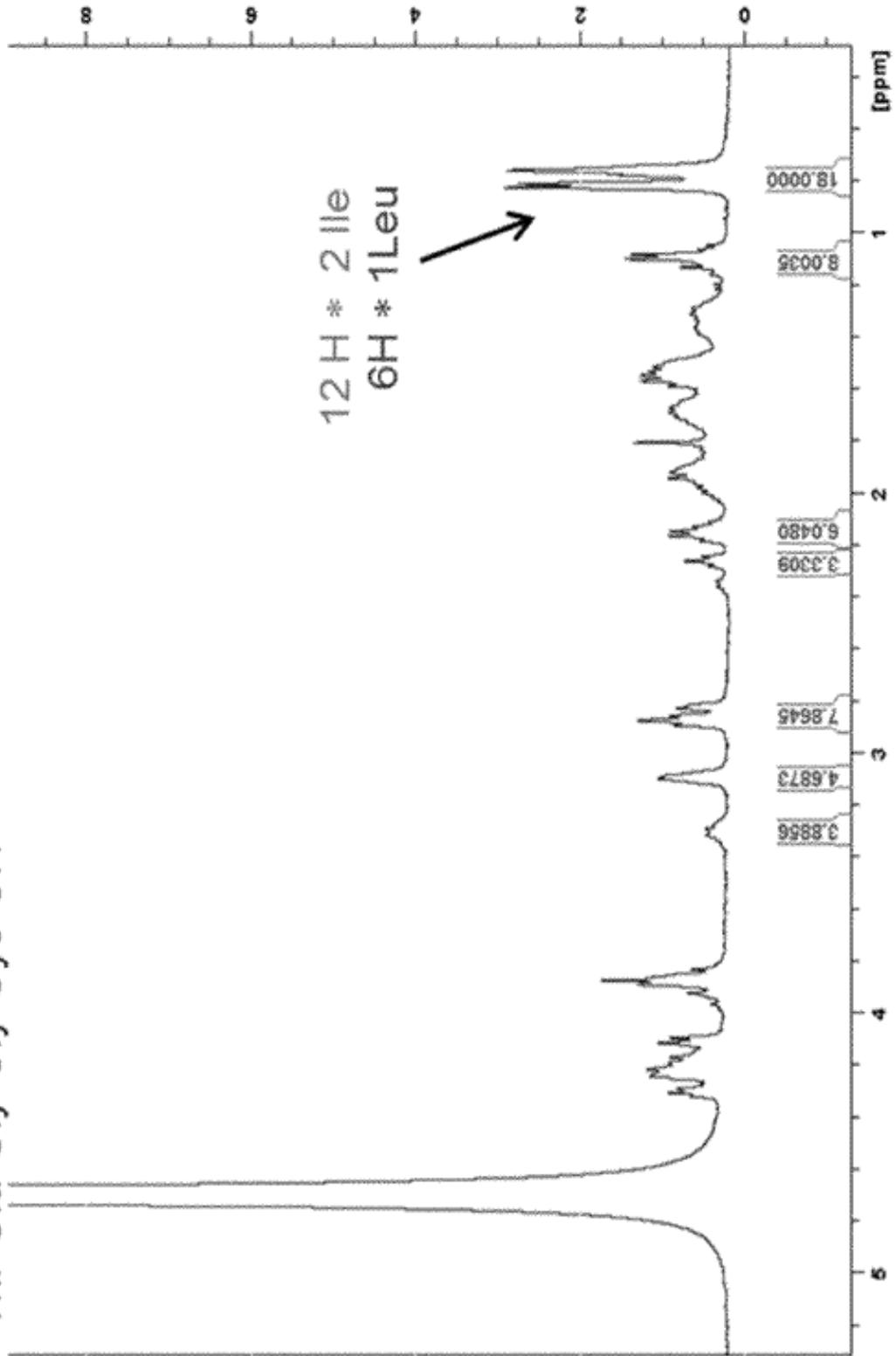


Figure 26

Hpwr1: H-Gln-Gly-Glu-Thr-Glu-Glu-Ala-Leu-Ile-Gln-Lys-Arg-Ser-Tyr-Gly-Gly-Cys-OH

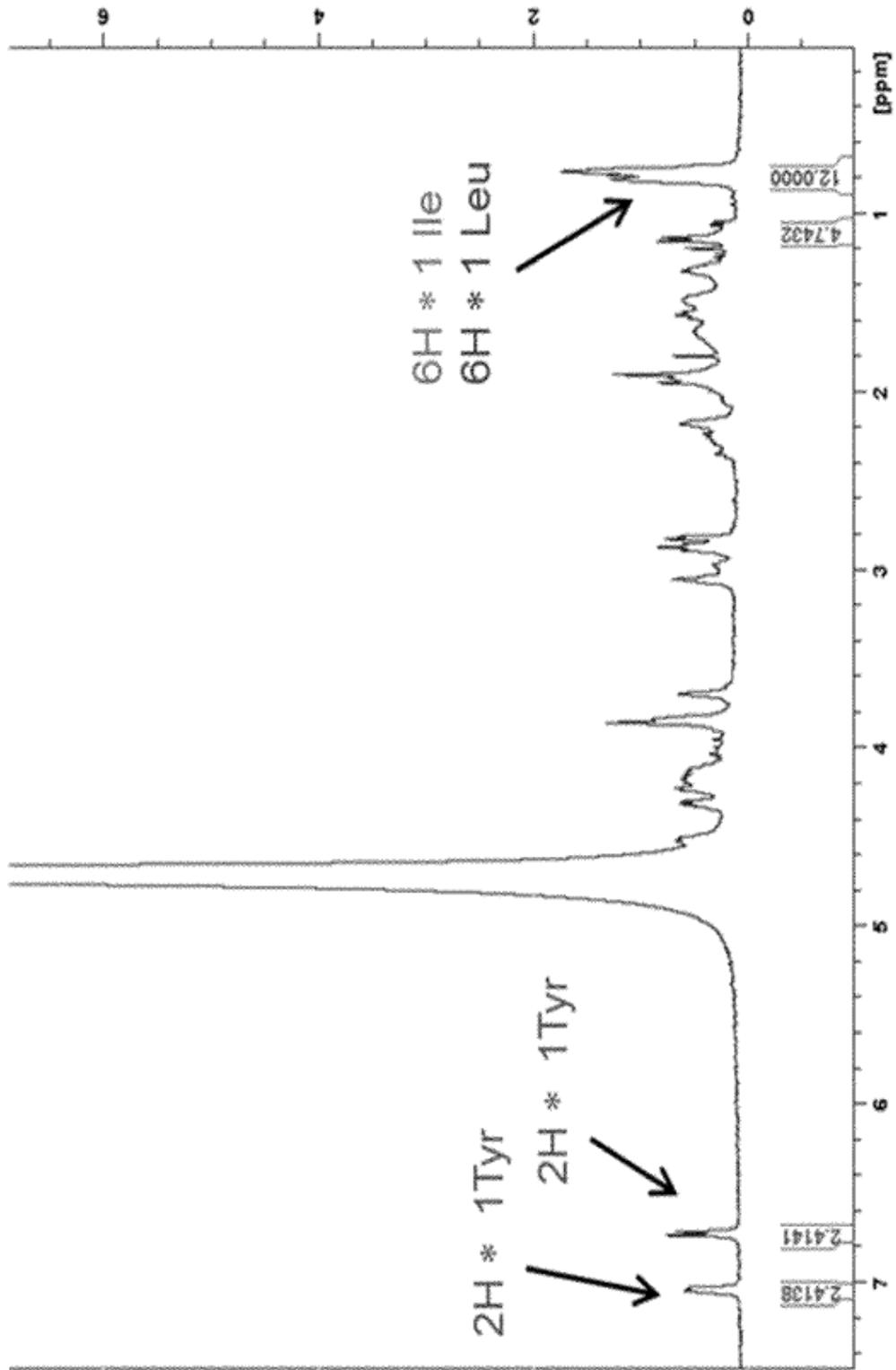


Figura 27

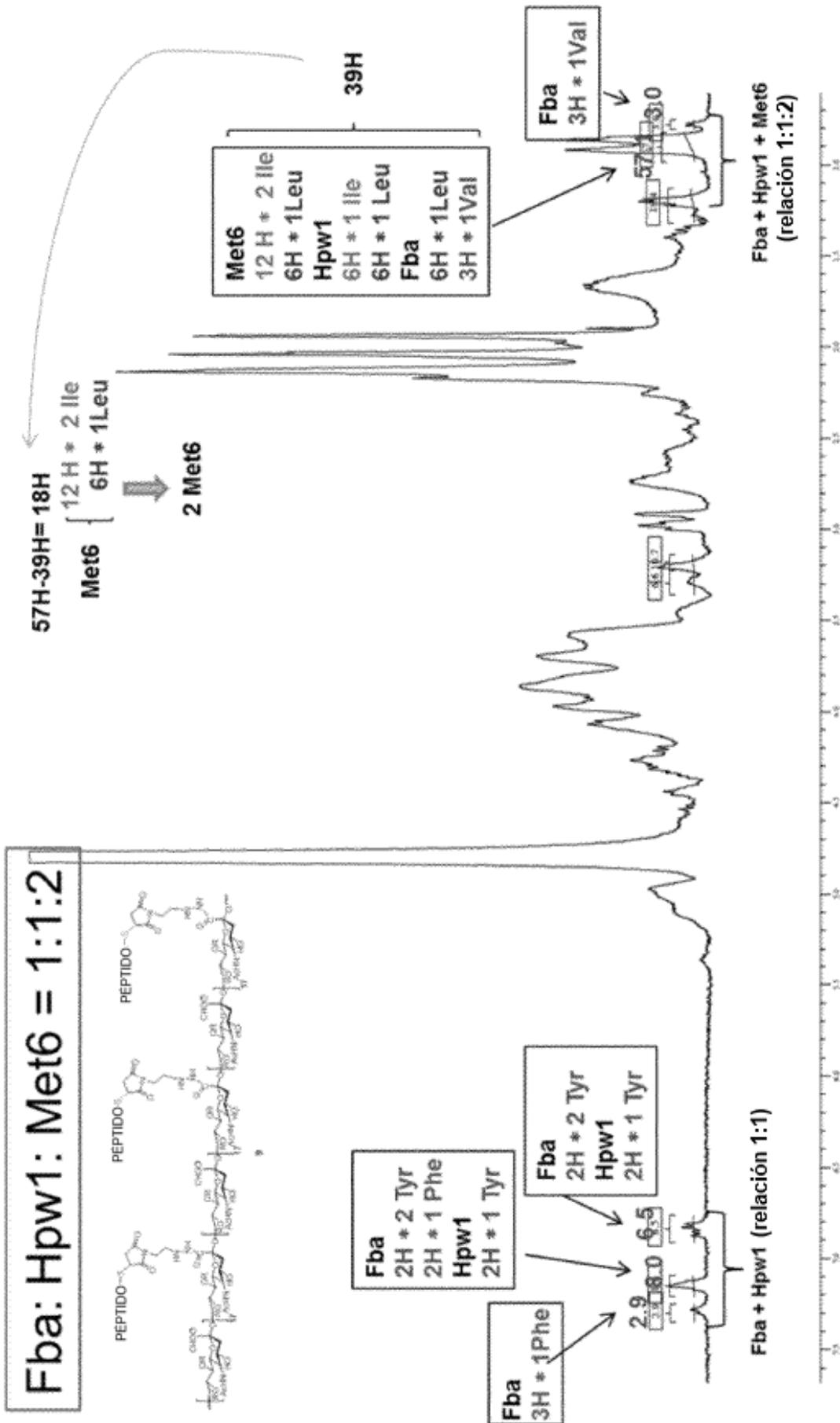


Figura 28

GLUCOPEPTIDOS	Sac/Péptido (mol/ siálico/mol péptido)
Fba C-term-MenC (KMUH) conj Lot1 4g	25
Fba C-term-MenC (KMUH) conj 6a	17
Fba N-term-MenC (KMUH) conj 6b	19
Fba C-term-MenC (BMPH) conj 8a	14,6
Fba N-term-MenC (BMPH) conj 8b	15,8
P2TT C-term-MenC (BMPH) conj 8c	12
P2TT N-term-MenC (BMPH) conj 8d	9,8
PV1 C-term-MenC (BMPH) conj 8f	9
PV1 N-term-MenC (BMPH) conj 8g	10,9
Fba Cterm, Met6, Hpw1-MenC (BMPH) conj 9	11,8
Met6 C-term-MenC (BMPH) conj 9a	11,3
Hpw1 C-term-MenC (BMPH) conj 9b	13

Figura 29

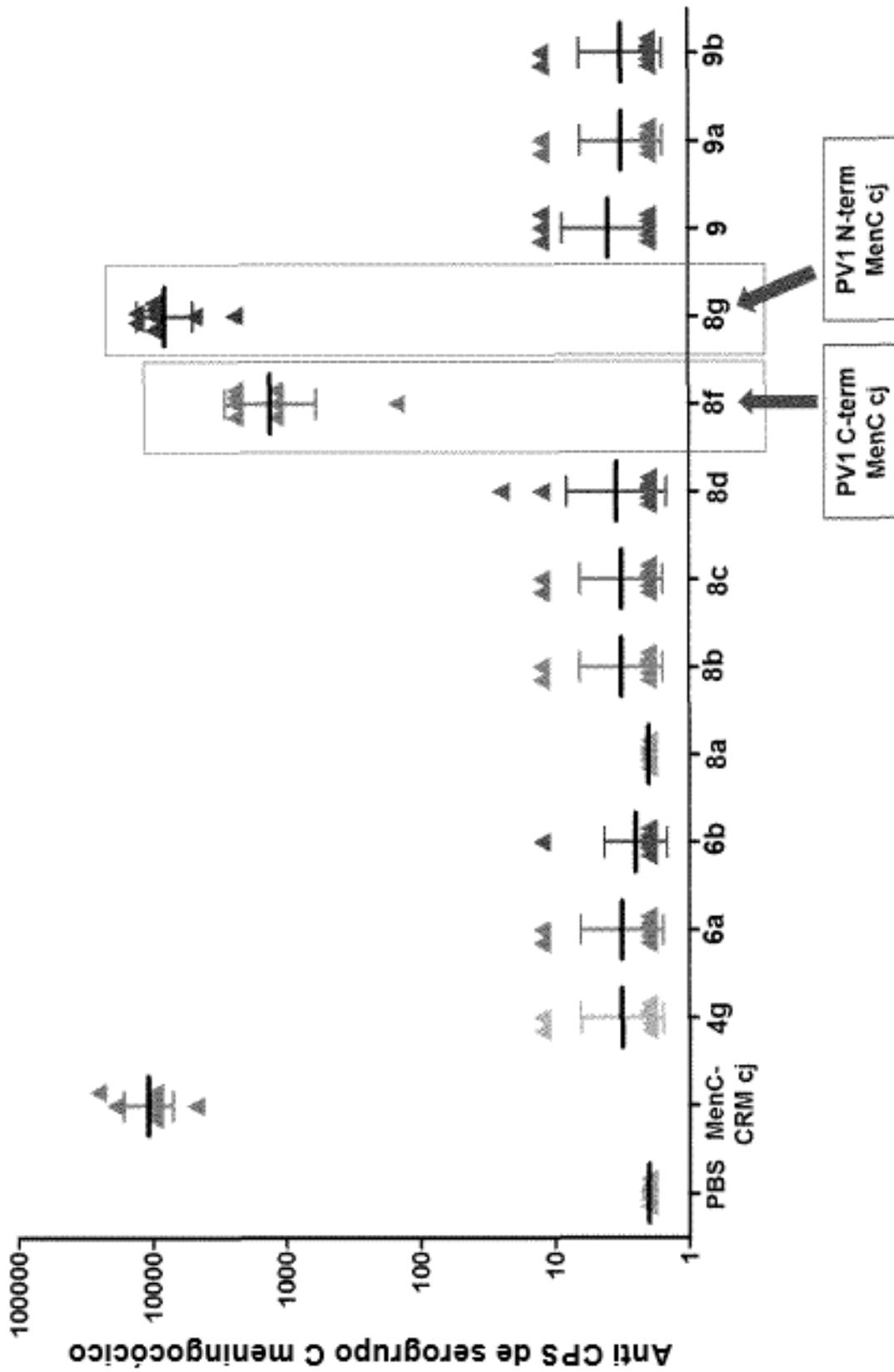


Figura 30

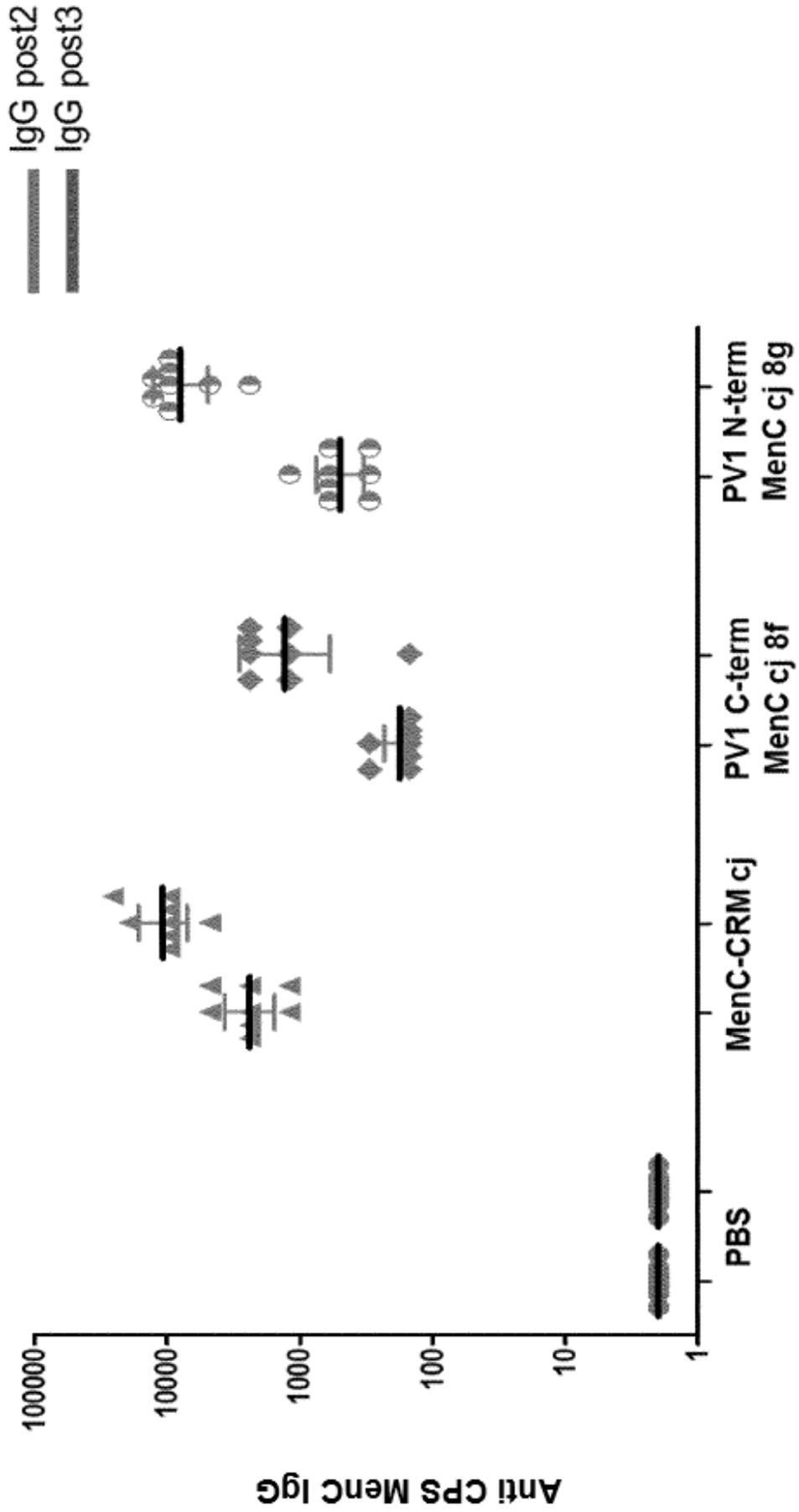


Figura 31

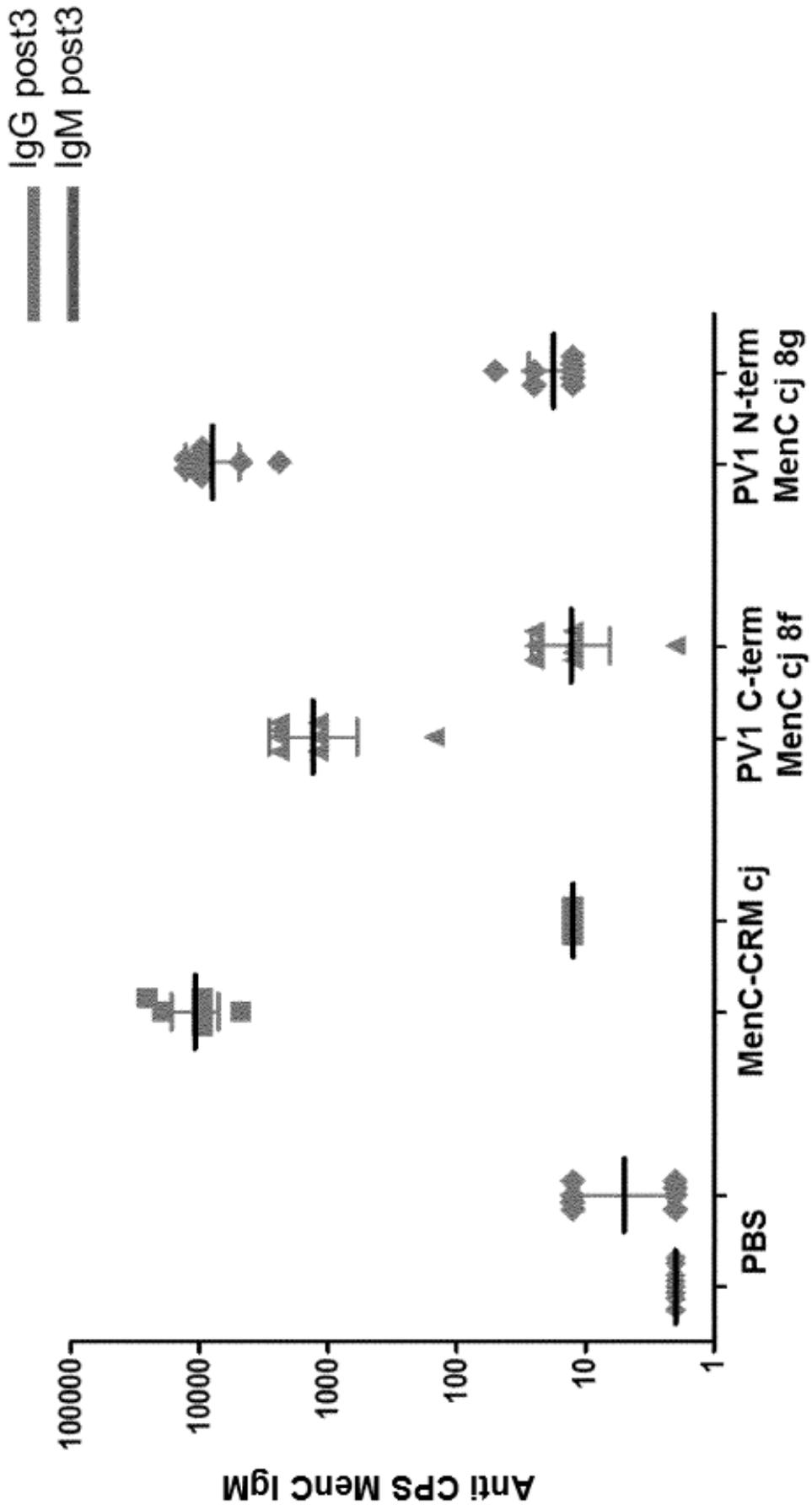


Figura 32

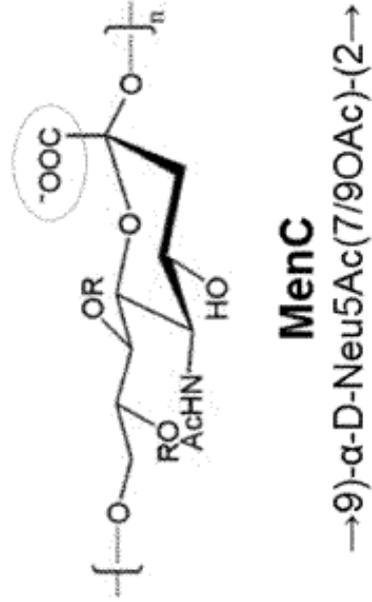
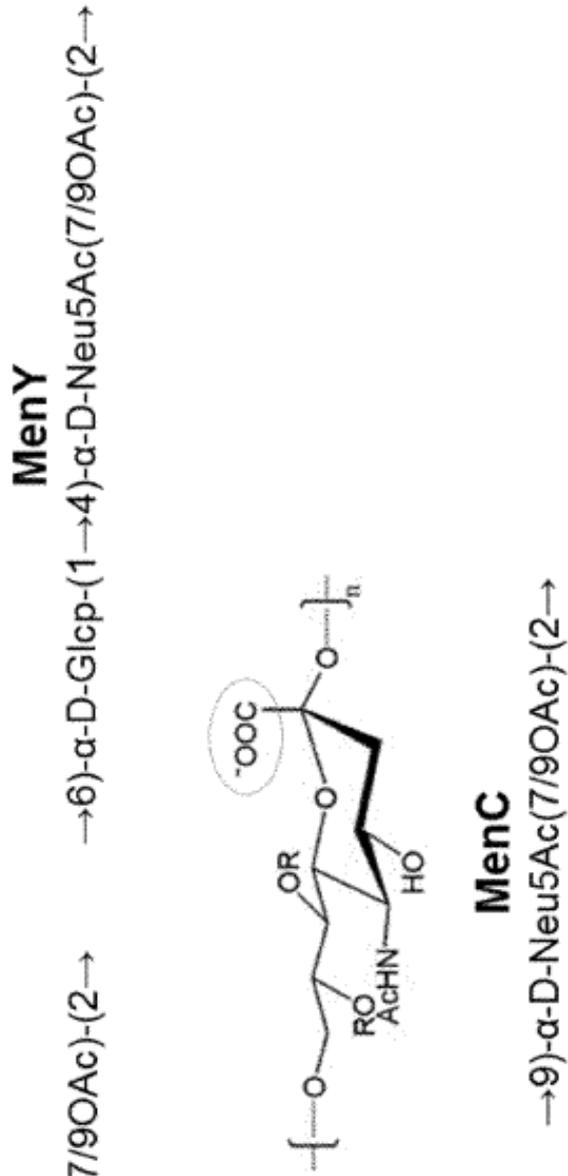
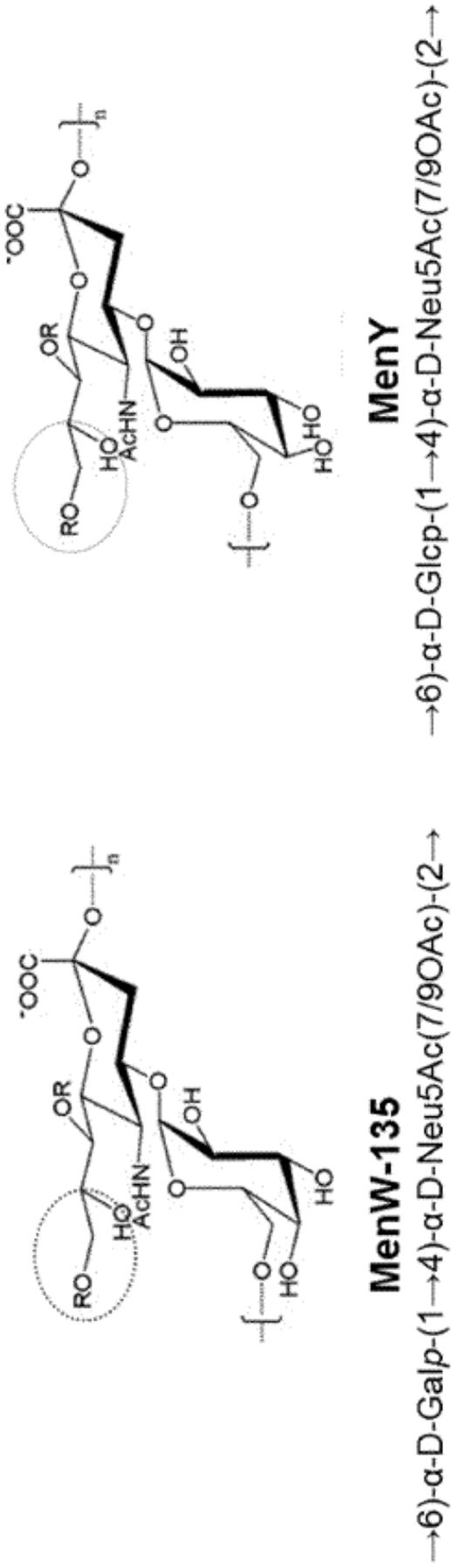


Figura 34

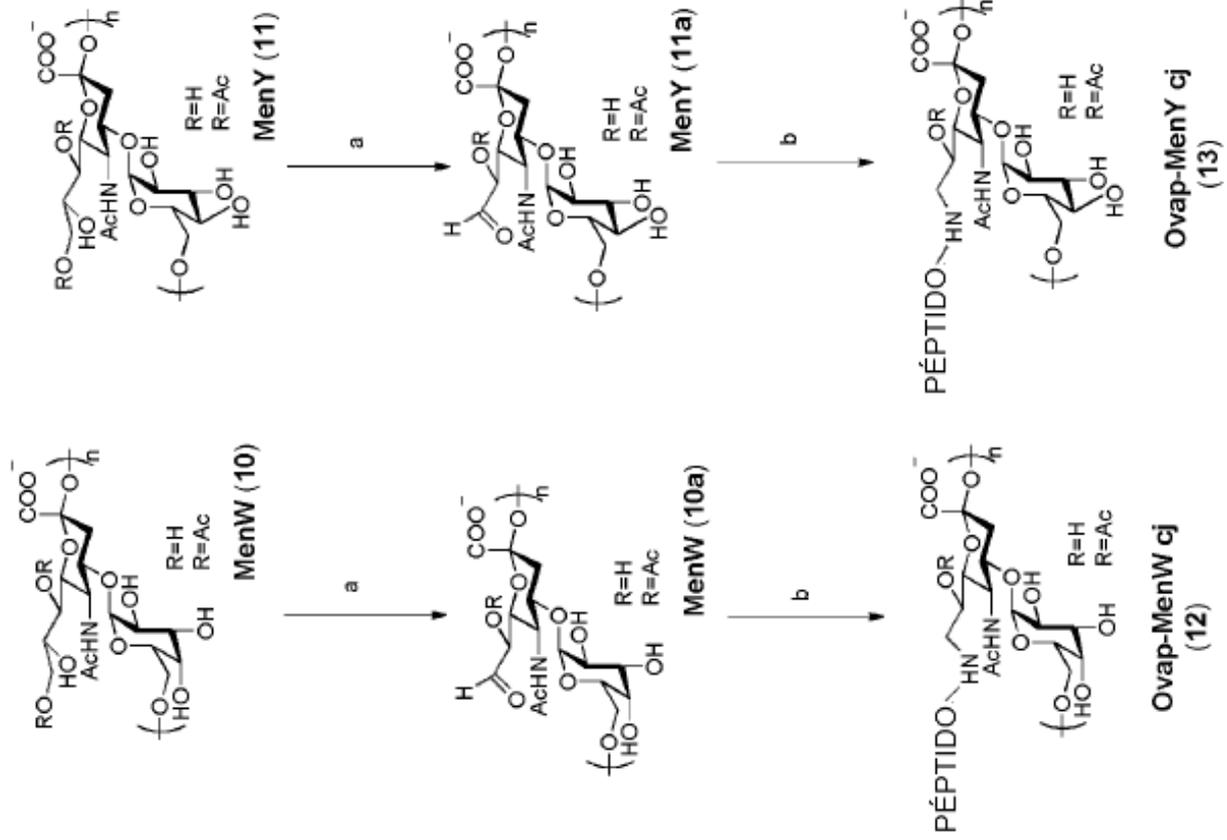


Figura 35

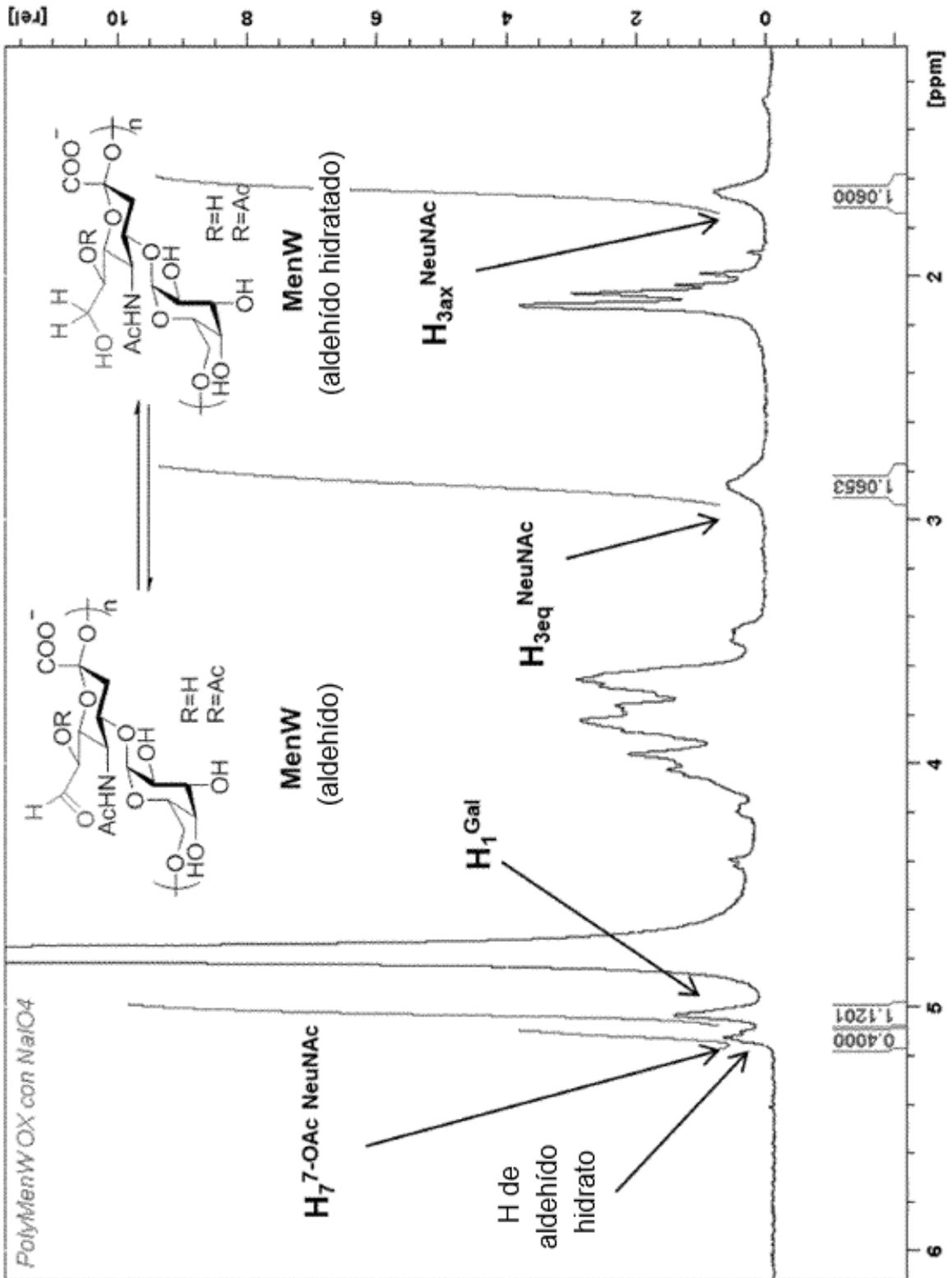


Figura 36

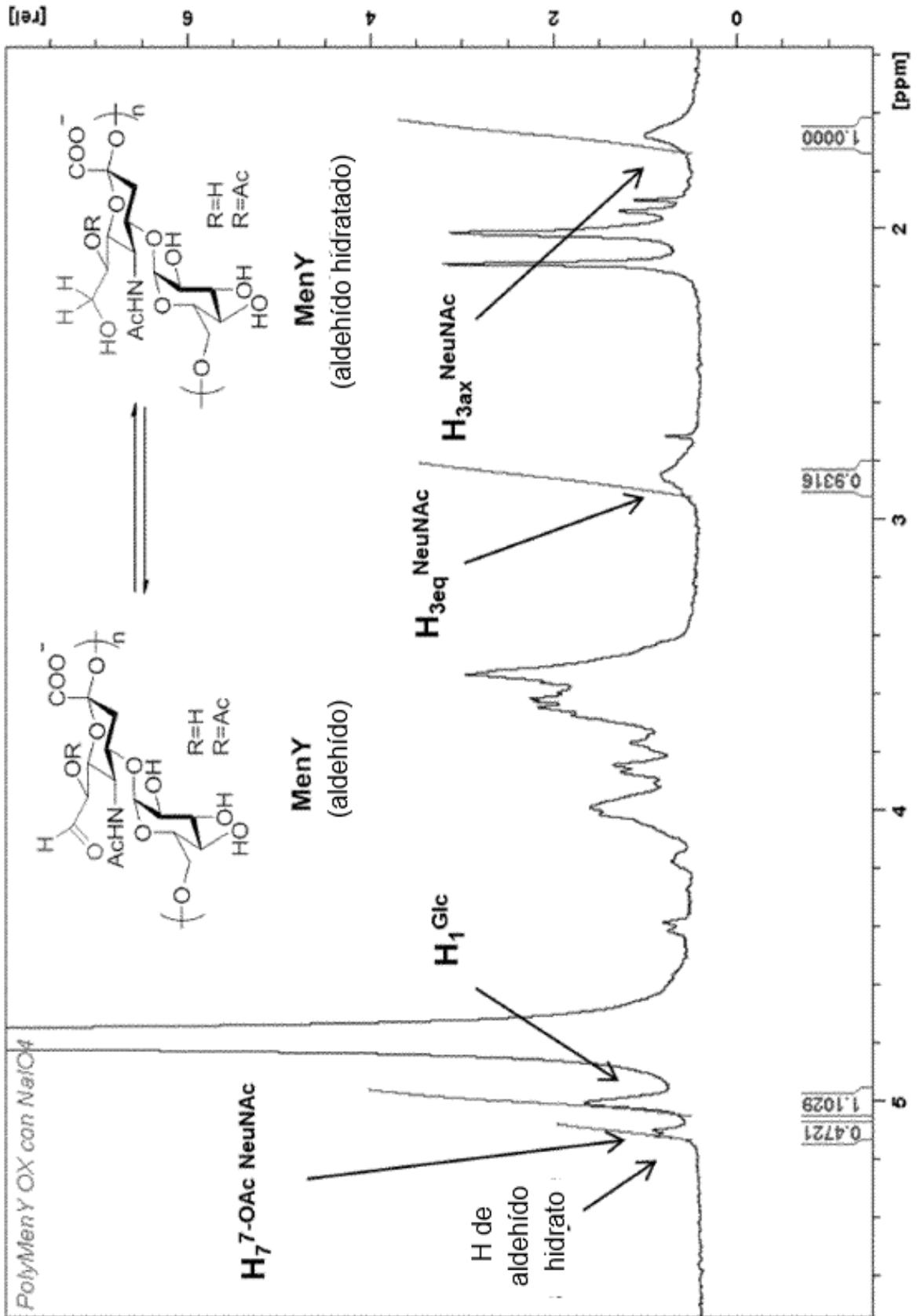
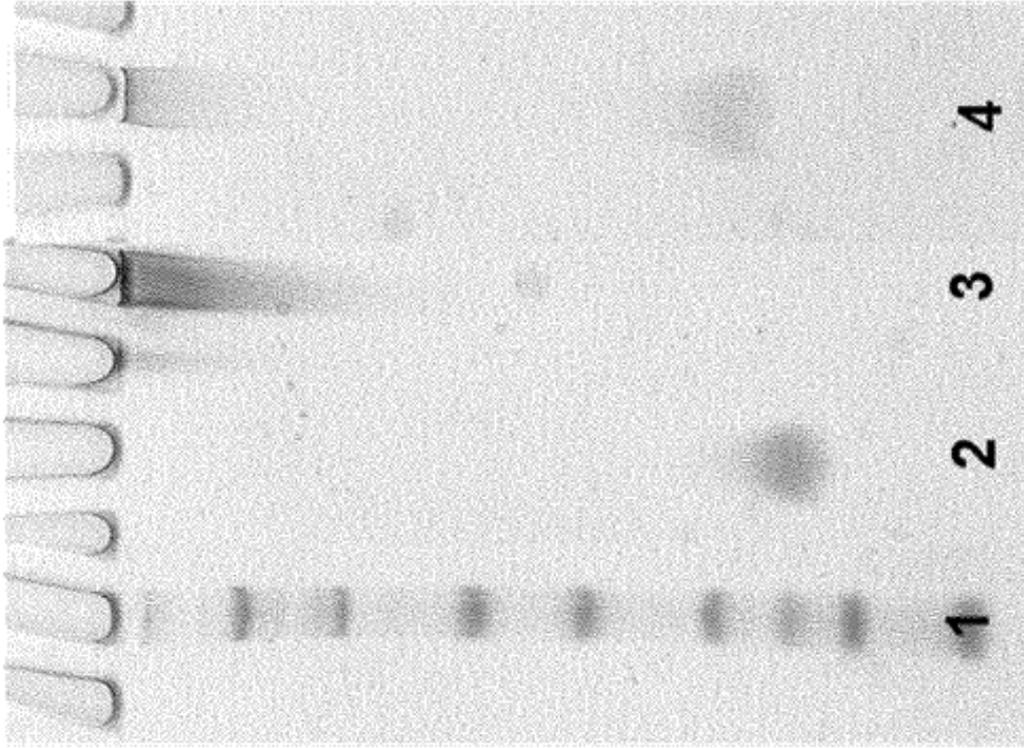


Figura 37

SDS page 4-12% B-T MES



- 1. Marcador
- 2. Ovap
- 3. Conj. PolimenW (12)
- 4. Conj. PoliMenY (13)

Figura 38

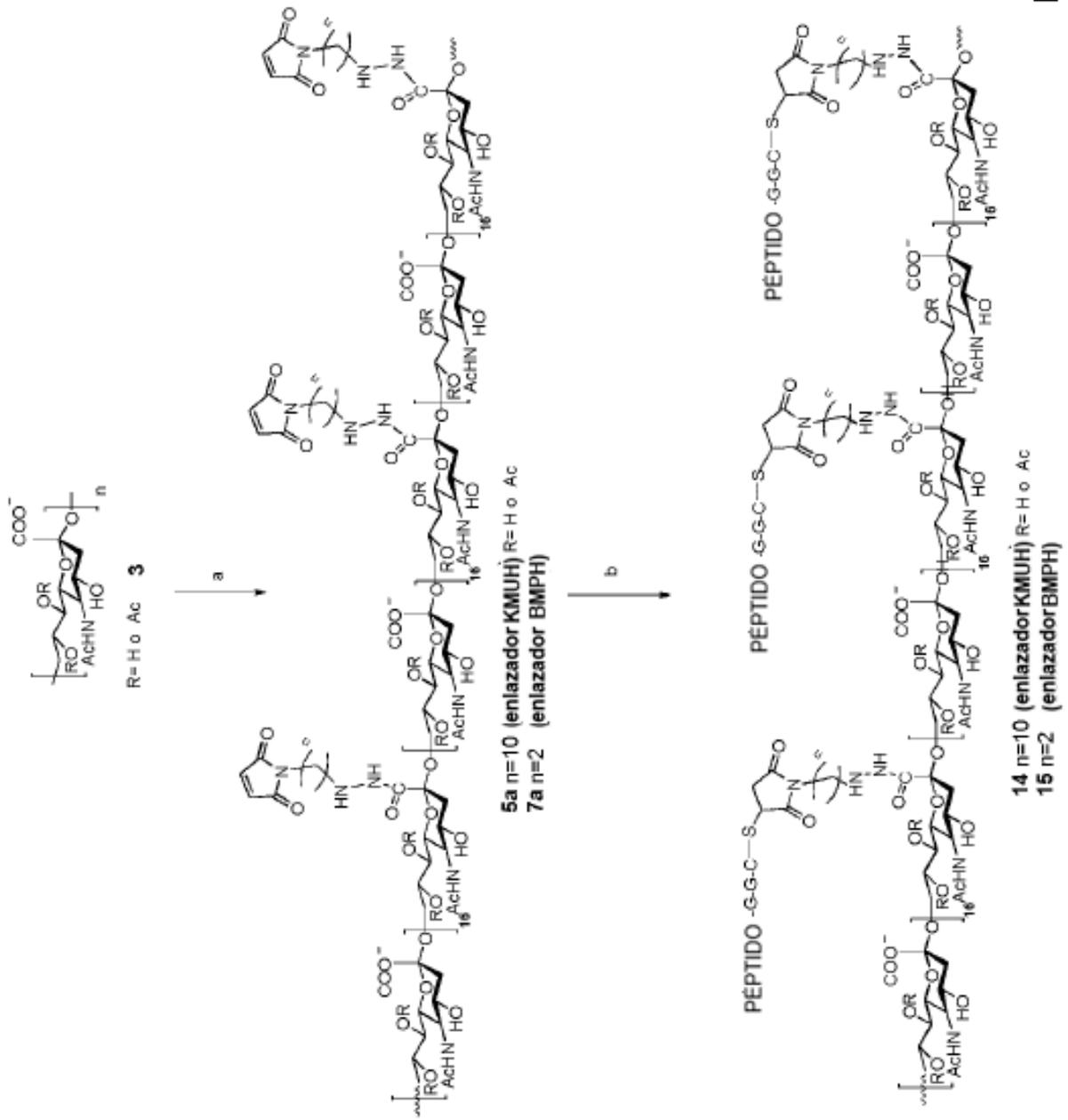
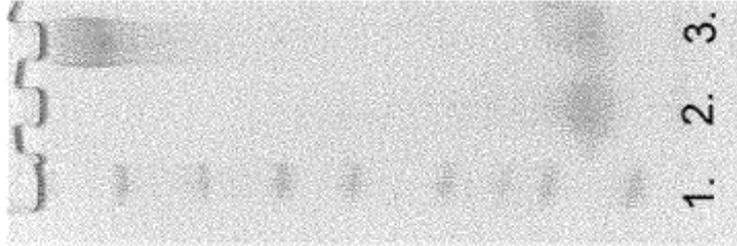


Figura 39

SDS page 4-12% B-T MES

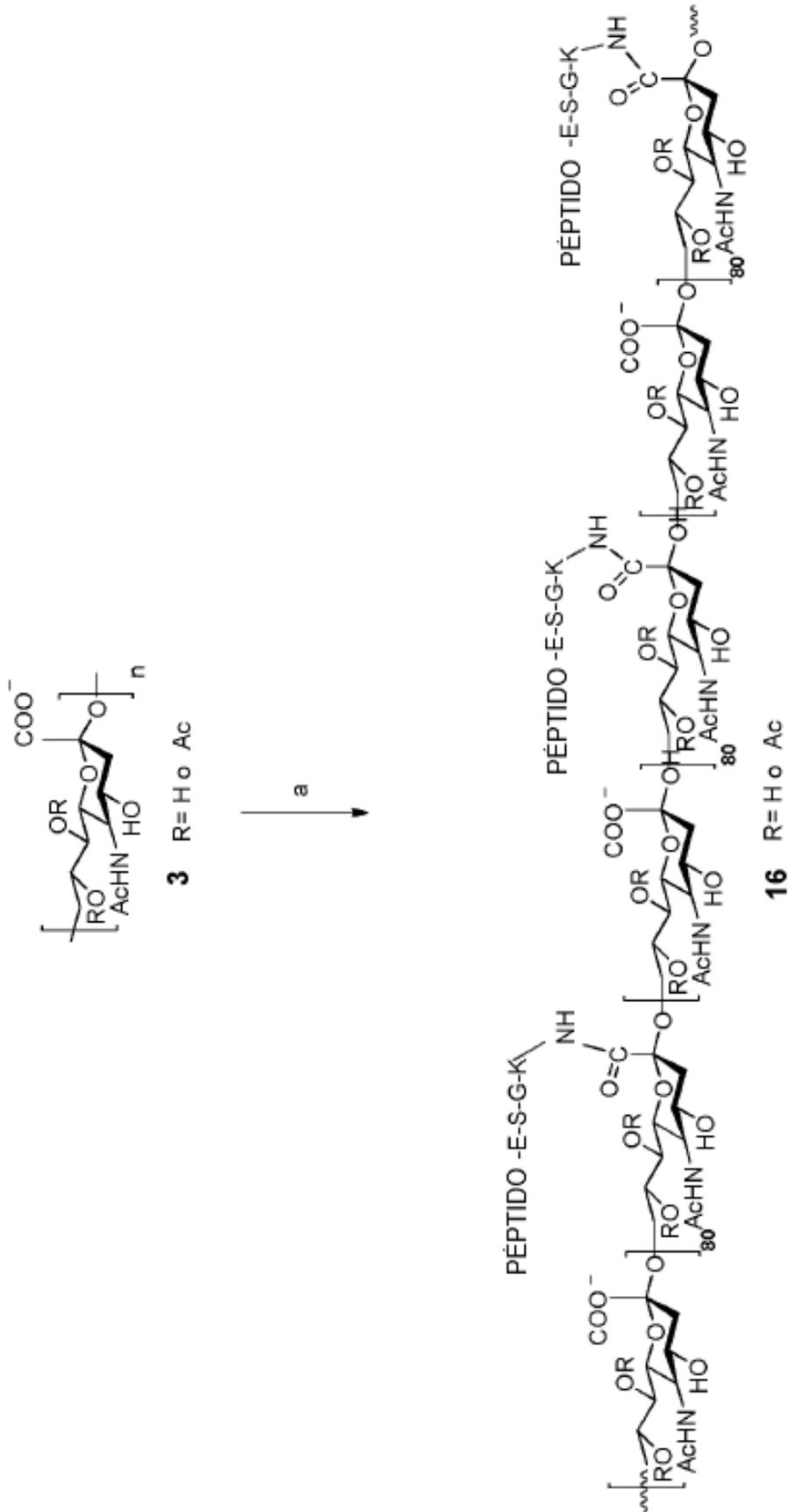


- 1. Marcador
- 2. Péptido Ova
- 3. Conj. PolimenC-KMUH 14

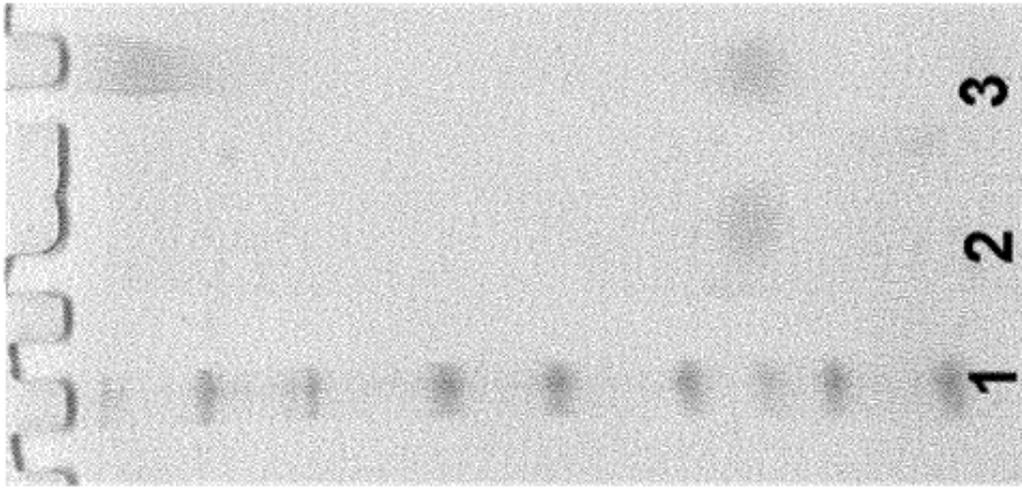


- 1. Marcador
- 2. Péptido Ova
- 3. Conj. PolimenC-BMPH 15

Figura 40



SDS page 4-12% B-T MES



1. Marcador
2. Ovap
3. Conj. PolimenC 16

Figura 42

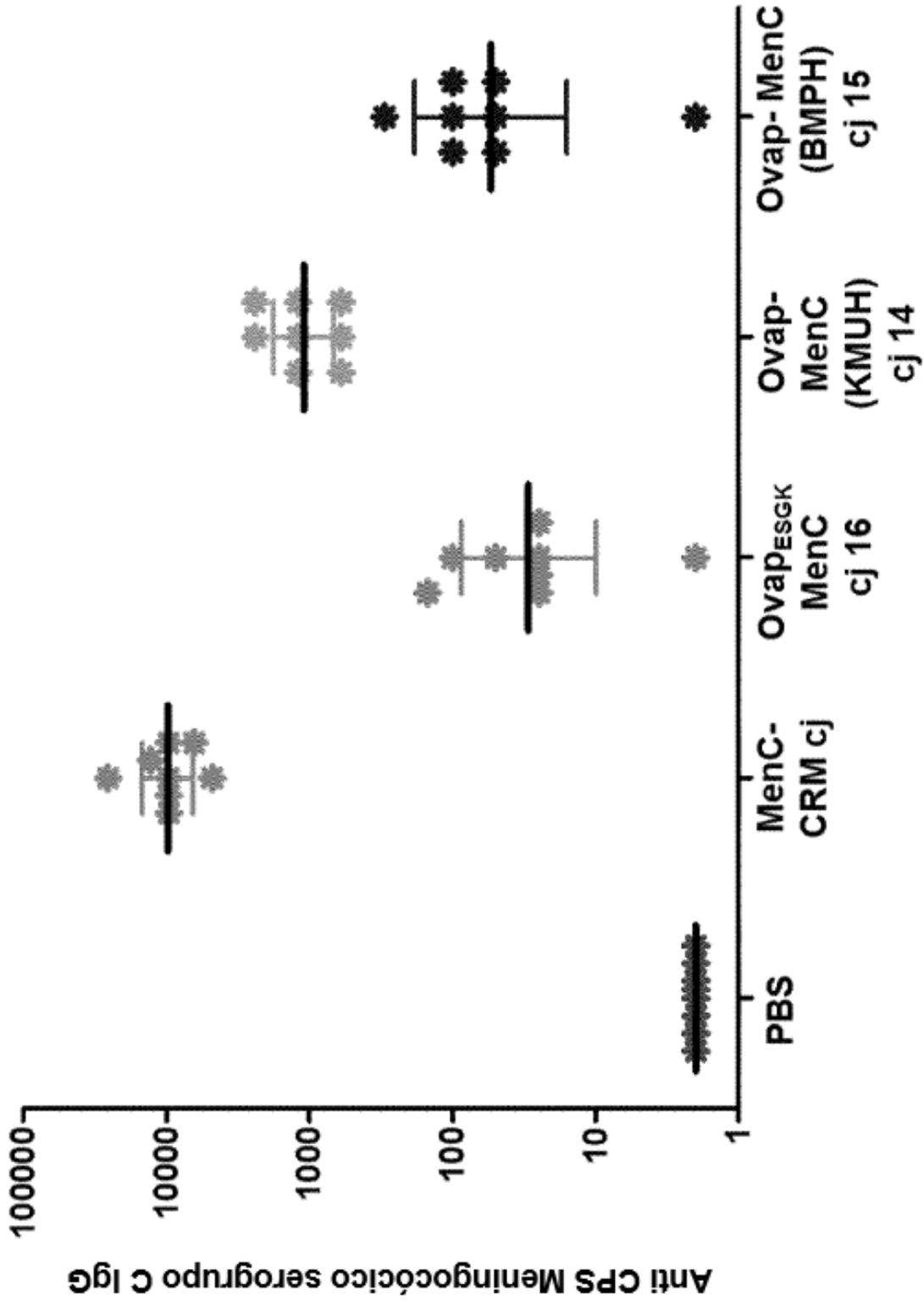


Figura 43

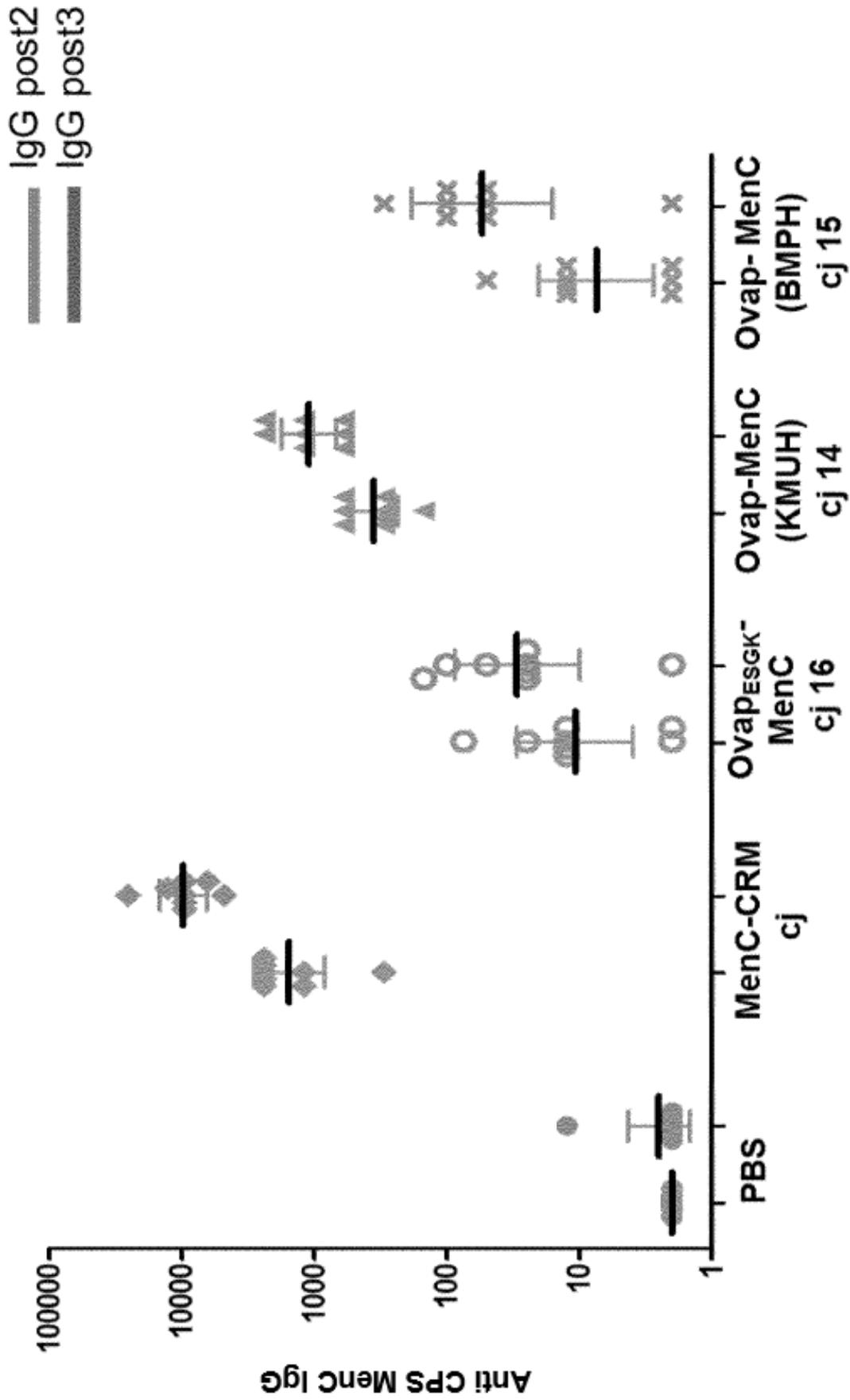


Figura 44

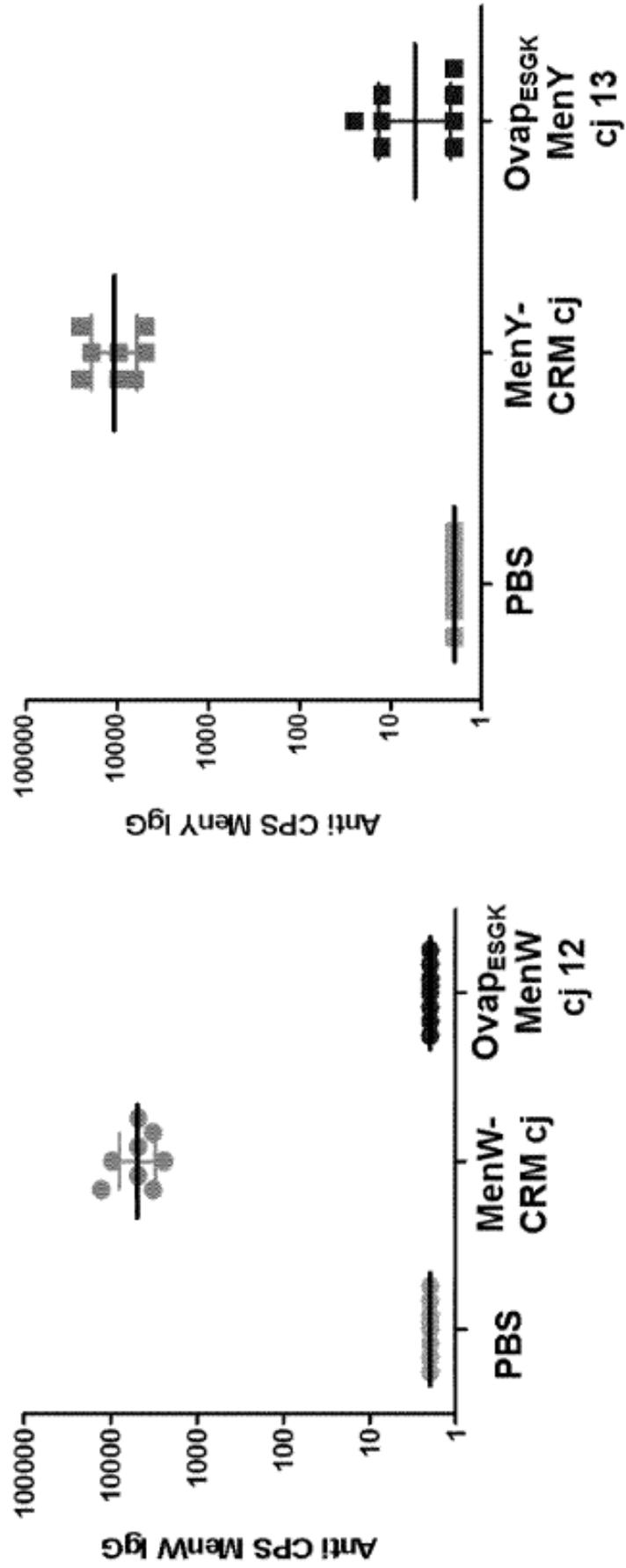


Figura 45

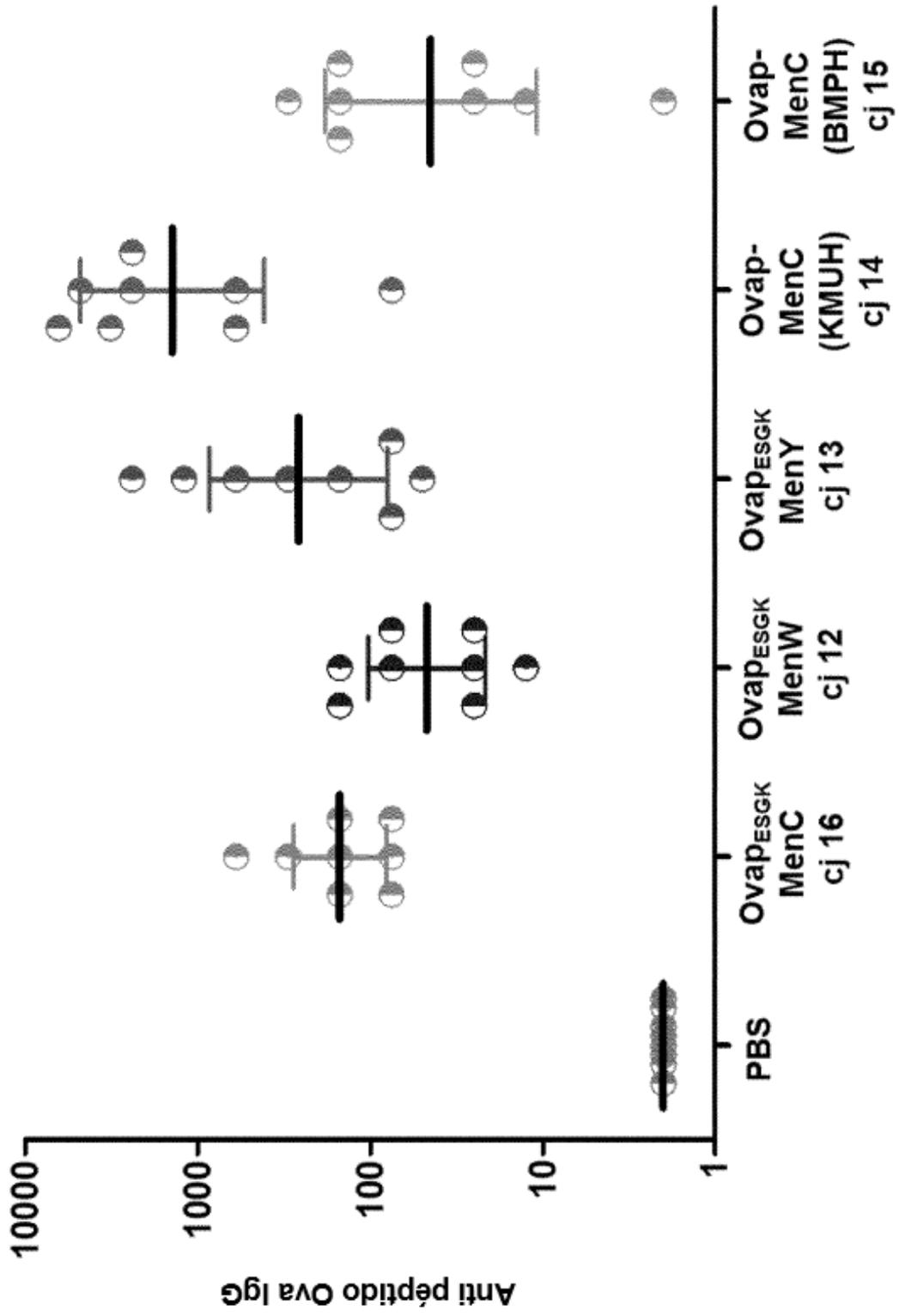


Figura 46

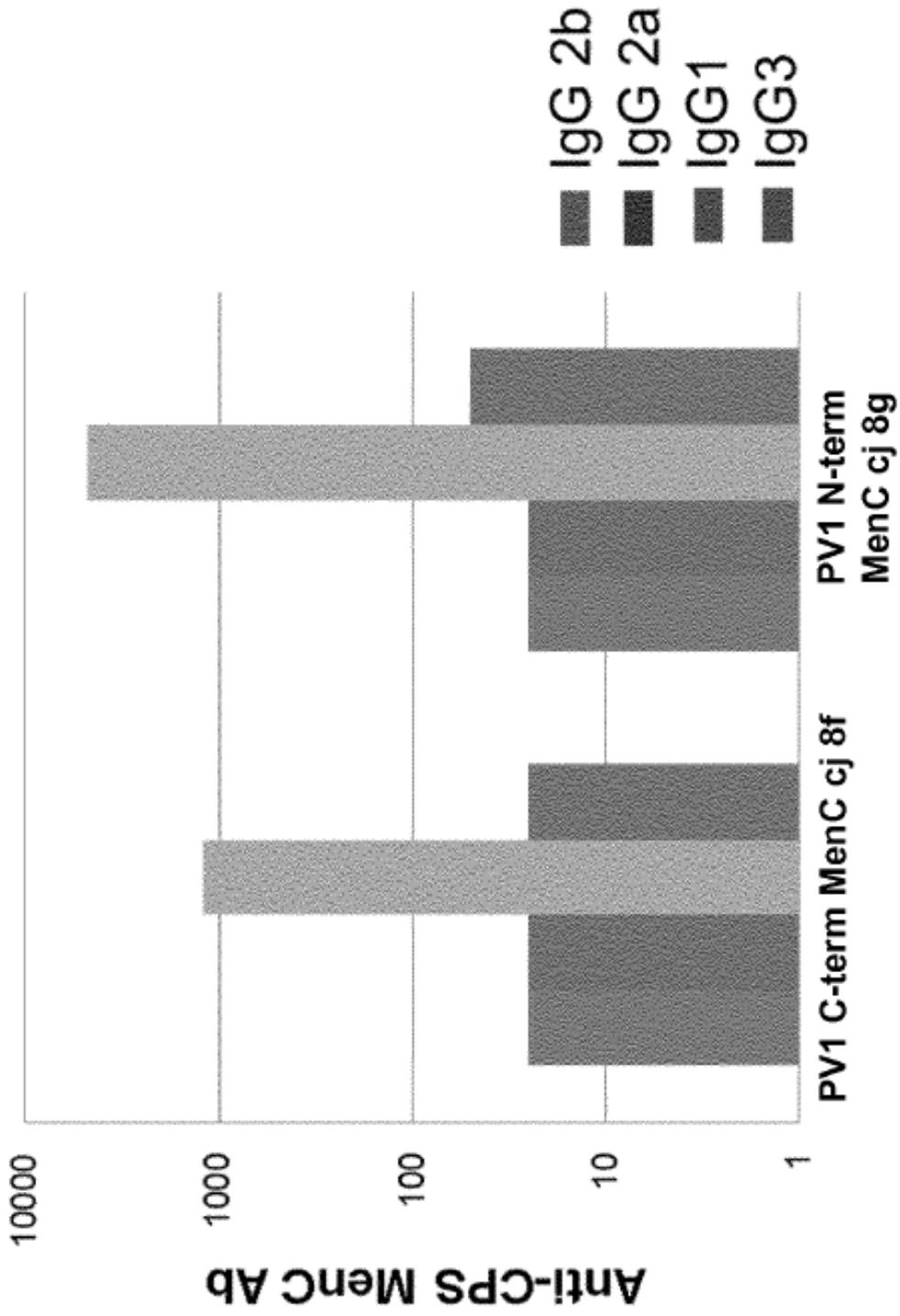


Figura 47

