

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 783**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/08** (2006.01)

**C07H 15/256** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/EP2013/065708**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14016374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13742207 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2877479**

54 Título: **Proceso para la purificación de saponinas**

30 Prioridad:

**27.07.2012 GB 201213364**

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

**11.04.2019**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)**

**Rue de l'Institut, 89**

**1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**DIAZ GARCIA, JUAN JOSE y**

**HOLZER, MARGIT THERESIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 708 783 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**

Proceso para la purificación de saponinas

**Campo de la invención**

5 La presente divulgación se relaciona con la purificación de productos biológicos. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a la purificación de saponinas útiles como adyuvantes.

**Antecedentes de la invención**

10 Saponinas, esteroides o glucósidos triterpenoides que se encuentran ampliamente en el reino vegetal, tienen una amplia gama de usos medicinales y comerciales. Se ha mostrado que las saponinas de algunas especies de plantas son útiles como adyuvantes que pueden usarse para mejorar las respuestas inmunes a antígenos específicos. Algunos tipos de adyuvantes de saponina de plantas no solo mejoran las respuestas inmunes a los antígenos, sino que también pueden inducir preferentemente tipos específicos de respuestas inmunes mediadas por células.

Los procedimientos actuales para la purificación de saponinas farmacológicamente útiles no son óptimos en términos de uniformidad, reconstituibilidad u homogeneidad del producto. Además, los procedimientos actuales de purificación de saponinas pueden demorar hasta 14 días.

15 En vista de la utilidad potencial de las composiciones inmunogénicas que contienen saponinas, existe la necesidad de procedimientos de purificación de saponinas más eficientes.

El documento US5057540 divulga un procedimiento para el aislamiento de la saponina QS-21 de Quillaja.

El documento US6231859 divulga un procedimiento para purificar saponinas.

**Sumario de la invención**

20 La presente divulgación se relaciona con un procedimiento para purificar al menos una saponina en una solución que comprende las etapas de:

- a. proporcionar al menos una saponina en un primer disolvente que comprende un componente solubilizante;
- b. reemplazar al menos una porción del componente solubilizante con un disolvente de intercambio por uno o más de: diafiltración, ultrafiltración o diálisis, produciendo así un disolvente reemplazado;
- 25 c. eliminar el disolvente reemplazado mediante liofilización, para producir un producto de saponina seco que comprende al menos una saponina;

en el que el primer disolvente comprende al menos una saponina parcialmente purificada seleccionada del grupo QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21; y

el primer disolvente comprende al menos 22 % en volumen/volumen de acetonitrilo; y

30 el disolvente reemplazado no comprende más del 21 % en volumen/volumen de acetonitrilo.

**Descripción detallada de la invención**

Introducción

35 La presente divulgación se refiere a procedimientos para producir saponinas purificadas, tales como QS-21. El procedimiento divulgado aquí reduce a uno el número de ciclos de liofilización necesarios, por una etapa de intercambio de disolventes y la exposición posterior opcional del producto de saponina purificado a al menos una exposición a gas seco, seguido de la exposición a un vacío para eliminar aún más el producto de saponina purificada de moléculas de disolvente residual.

40 Las saponinas purificadas se usan con fines medicinales, industriales y en productos de alimentos y bebidas. Algunas saponinas, tales como las que se extraen de la corteza del árbol sudamericano Quillaja saponaria Molina (saponinas de Quillaja), por ejemplo, QS-21, tienen un valor farmacológico como adyuvantes inmunológicos porque exhiben baja toxicidad al tiempo que inducen respuestas inmunes fuertes de tipo Th1 y Th2 cuando se coadministran con un antígeno. Además, se ha demostrado que tales saponinas provocan respuestas moderadas de linfocitos T citotóxicos a algunas proteínas.

45 Para que se usen de manera segura, las saponinas deben separarse de otros materiales derivados de la planta, incluyendo, en el caso de las saponinas de Quillaja, otras saponinas más tóxicas. Aunque existen procedimientos para purificar saponinas, los procedimientos de purificación actuales pueden demorar hasta 14 días. Las saponinas producidas por los procedimientos actuales pueden ser no homogéneas.

La purificación de saponina por los procedimientos divulgados proporciona varios beneficios significativos sobre los procedimientos actuales. Específicamente, el procedimiento divulgado aquí ofrece el beneficio de que puede reducir el tiempo requerido para los procedimientos de purificación de saponina a gran escala en casi la mitad del tiempo requerido para los procedimientos actuales. Los procedimientos actuales pueden tardar hasta 14 días, mientras que el tiempo total de purificación con el presente procedimiento puede ser de solo 6 días. Además, las saponinas purificadas por el procedimiento aquí descrito no retienen más disolvente o agua que los productos de saponinas purificadas obtenidos usando los procedimientos actuales, que típicamente involucran múltiples etapas de liofilización que pueden durar el doble de tiempo. El agua en el producto final contribuye a la degradación del producto en composiciones de saponina purificada. Además, los componentes de disolventes, como las moléculas orgánicas, generalmente deben reducirse significativamente de los productos de saponina secos para su uso farmacológico seguro.

El procedimiento divulgado aquí es más beneficioso que los procedimientos actuales porque, al obviar la necesidad de una segunda liofilización, produce un producto de saponina seco más homogéneo que los procedimientos actuales que requieren dos etapas de liofilización.

Por lo tanto, un aspecto de la presente divulgación se relaciona con un procedimiento para producir composiciones de saponina altamente purificadas. El procedimiento divulgado aquí da como resultado la producción de un producto de saponina purificada altamente homogéneo con poca o ningún agua residual o moléculas de disolvente. La divulgación aquí proporciona un procedimiento para purificar al menos una saponina en una solución proporcionando al menos una saponina en un primer disolvente que incluye un componente solubilizante; reemplazar al menos una porción del componente solubilizante con un disolvente de intercambio por uno o más de: diafiltración, ultrafiltración o diálisis, produciendo así un disolvente reemplazado; eliminar el disolvente reemplazado por liofilización, para producir un producto de saponina seco que incluye al menos una saponina; en el que el primer disolvente comprende al menos una saponina parcialmente purificada seleccionada del grupo QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21; y el primer disolvente comprende al menos 22 % en volumen/volumen de acetonitrilo; y el disolvente reemplazado no comprende más del 21 % en volumen/volumen de acetonitrilo. Una etapa opcional adicional comprende poner en contacto el producto de saponina seco con un gas seco de modo que cualquier molécula de disolvente que quede en el producto de saponina seca se disperse en el gas, produciendo así un producto de saponina seca depurado con gas. En el contexto de la purificación de saponinas, la purificación incluye proporcionar una solución que comprende al menos una saponina y reemplazar al menos una porción del componente solubilizante con un disolvente de intercambio. Opcionalmente, antes de la purificación de la solución, las saponinas se pueden aislar de otros componentes de la solución (e.g., material vegetal, tejido de un organismo, sustancias químicas y moléculas no deseadas, así como otros residuos) mediante diversos procedimientos químicos o cromatográficos.

Opcionalmente, la saponina en un primer disolvente se puede purificar parcialmente mediante cromatografía en columna. Por ejemplo, la saponina en un primer disolvente puede proporcionarse en forma de columna de HPLC o eluido de columna de cromatografía de fenilo. Por ejemplo, la saponina en un primer disolvente se puede proporcionar en forma de eluido de columna de HPLC C8. Típicamente, el eluato de columna de HPLC C8 utilizado para la purificación de saponina incluye al menos 22 % de acetonitrilo vol/vol. Por lo tanto, la saponina en un disolvente puede incluir al menos el 22 %. Por ejemplo, la saponina en un primer disolvente puede incluir al menos aproximadamente 50 % de acetonitrilo. Además, la saponina en un primer disolvente puede incluir entre aproximadamente 30 % y 65 % en volumen/volumen de acetonitrilo. Por ejemplo, entre aproximadamente 40 % y un 62 % en volumen/volumen de acetonitrilo es un intervalo adecuado. Por ejemplo, la saponina en un disolvente puede incluir aproximadamente entre aproximadamente 58 % y un 62 % en volumen/volumen de acetonitrilo. El término aproximadamente se incluye en las concentraciones de acetonitrilo indicadas anteriormente para indicar que el valor dado es aproximado y puede variar en más o menos 5 %.

Después de obtener una solución de saponinas en un disolvente, se puede realizar un reemplazo del disolvente. El reemplazo de al menos una parte del componente solubilizante se puede hacer intercambiando un volumen idéntico o no idéntico del primer disolvente con un disolvente de intercambio. El reemplazo del disolvente se logra mediante cualquiera de diafiltración, ultrafiltración o diálisis. Típicamente, el disolvente reemplazado contendrá al menos 15 % vol/vol de acetonitrilo pero no más de 21 % vol/vol de acetonitrilo.

Opcionalmente, la sustitución de al menos una porción del componente solubilizante se puede realizar en un sistema que incluye un recipiente de contención semipermeable que es selectivamente permeable de modo que al menos un componente de disolvente pase a través de la parte permeable del recipiente y al menos una saponina se retendrá cuando al menos una saponina y un primer disolvente se introduzcan en el recipiente de contención semipermeable. Por ejemplo, el recipiente de contención semipermeable usado puede incluir una sola membrana semipermeable y el reemplazo del disolvente se puede lograr sumergiendo el recipiente de contención semipermeable que comprende al menos una saponina y un primer disolvente en un disolvente de intercambio y permitiendo que los disolventes separados por la membrana alcancen el equilibrio por difusión.

Alternativamente, el recipiente de contención semipermeable puede incluir un canal permeable a la solución que incluye la al menos una saponina en un disolvente que está rodeado por al menos una estructura semipermeable. En esta realización, la al menos una saponina y un primer disolvente se pueden mover a través del canal del

recipiente de contención a una presión positiva en relación con el exterior del recipiente por medio de presión hidrostática de manera que al menos un componente de la solución es forzado hacia el exterior a través de la porción semipermeable del recipiente de contención (e.g., cualquier porción de la estructura semipermeable que no esté en contacto con el canal) y al menos una molécula de la solución recorre toda la longitud del canal. En esta  
5 realización, al menos una porción del componente solubilizante puede reemplazarse con un disolvente de intercambio agregando el disolvente de intercambio al interior (e.g., el canal) del recipiente de contención.

En otra realización, el recipiente de contención semipermeable puede incluir un recipiente no permeable que incluye un primer compartimento y un segundo compartimento separados por una membrana semipermeable. En esta  
10 realización, la al menos una saponina y un primer disolvente se pueden colocar en el primer compartimento del recipiente de contención, que luego se puede hacer una presión positiva en relación con el segundo compartimento, de manera que al menos un componente de la solución se pueda forzar a lo largo de la porción semipermeable del recipiente de contención y al menos una porción del componente solubilizante puede reemplazarse con un disolvente de intercambio mediante la adición del disolvente de intercambio al primer compartimento del recipiente.

Después del reemplazo del disolvente, el disolvente reemplazado se puede eliminar del producto de saponina para producir un producto de saponina seco. La eliminación del disolvente reemplazado se realiza por liofilización. Se proporciona un procedimiento de liofilización de ejemplo en la sección de Ejemplos. Sin embargo, la liofilización puede realizarse esencialmente por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Opcionalmente, la liofilización se puede realizar en bandejas LYOGUARD™ desechables de la marca Gore. Opcionalmente, se puede realizar más de una etapa de eliminación, e.g., si se desea un secado adicional de la muestra.

Opcionalmente, después de la eliminación del disolvente, se puede eliminar aún más del producto de saponina seco, cualquier molécula de disolvente restante poniendo en contacto el producto de saponina secada con un gas seco para producir un producto de saponina seca limpiada con gas. Opcionalmente, el producto de saponina seco puede ponerse en contacto con un gas seco de vacío. En algunas realizaciones, el contacto del producto de saponina seco con un gas seco se realiza a una presión superior a 700  $\mu$ bar. Por ejemplo, el producto de saponina seco puede  
20 ponerse en contacto con gas seco a 800  $\mu$ bar de presión. Opcionalmente, el producto de saponina seco puede mantenerse en contacto con el gas seco durante al menos 1 minuto. Por ejemplo, el producto de saponina seco puede mantenerse en contacto con el gas seco durante 5 minutos o más.

Opcionalmente, después de poner en contacto el producto de saponina seco con un gas seco, se elimina el gas seco. Por ejemplo, tal eliminación puede efectuarse por presión de vacío. En algunas realizaciones, el gas seco se elimina mediante una presión de vacío de menos de 100  $\mu$ bar. Por ejemplo, el gas seco se puede eliminar con una presión de vacío de 50  $\mu$ bar. Opcionalmente, la presión de vacío se puede aplicar durante más de 1 minuto. Por ejemplo, la presión de vacío se puede aplicar durante 30 minutos.

Opcionalmente, después de la eliminación del gas seco por presión de vacío, se puede repetir una o más de las etapas anteriores de poner en contacto el producto de saponina seco con un gas seco. Opcionalmente, la presión del vacío puede elevarse a la presión atmosférica. En algunas realizaciones, el producto de saponina seco se mantiene en contacto con el gas seco durante al menos 1 minuto. Por ejemplo, el producto de saponina seco puede mantenerse en contacto con el gas seco durante 5 minutos o más.

Si se desea, después de la exposición repetida al gas seco, la eliminación de la presión de vacío se puede repetir cualquier número de veces. En algunas realizaciones, la etapa de poner en contacto el producto de saponina seco con un gas seco seguido de la etapa de eliminación a presión de vacío del gas seco se repite siete veces.

Opcionalmente, el contacto del producto de saponina seco con un gas seco seguido de la eliminación de la presión de vacío del gas seco puede ser superior a 2 °C. Por ejemplo, la puesta en contacto del producto de saponina seco con un gas seco seguido de la eliminación a presión de vacío del gas seco se puede realizar a más de 34 °C.

En algunas realizaciones, un gas inerte, en particular nitrógeno, se usa como un gas seco. Sin embargo, se puede usar cualquier gas libre de agua, no reactivo (o débilmente reactivo).

El procedimiento aquí divulgado es para producir productos de saponina purificada que contienen, al menos una saponina de Quillaja parcialmente purificada seleccionada del grupo QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21. Típicamente, las purificaciones incluyen al menos QS-21. Opcionalmente, sin embargo, las purificaciones podrían incluir más de un tipo de saponina de Quillaja. Igualmente, las purificaciones podrían incluir Quil-A. De manera similar, la composición también podría incluir una pluralidad de diferentes saponinas seleccionadas de diferentes clasificaciones (familias) de organismos.

La presente divulgación también se relaciona con la QS-21 altamente purificada producida de acuerdo con los procedimientos divulgados aquí.

La divulgación se relaciona además con el uso del producto de saponina QS-21 altamente purificado producido por el procedimiento divulgado en una composición inmunogénica. Típicamente, la composición inmunogénica incluye un epítipo antigénico capaz de producir una reacción inmunogénica a un antígeno, e.g., de un patógeno y saponinas QS-21 altamente purificadas producidas por el procedimiento divulgado. Opcionalmente, la composición

inmunogénica puede incluir además una o más saponinas de Quillaja adicionales seleccionadas del grupo QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21. De manera similar, la composición inmunogénica puede incluir además una o más saponinas diferentes, seleccionadas de diferentes clasificaciones (familias) de organismos. Opcionalmente, la composición inmunogénica también incluye un segundo adyuvante. El adyuvante puede ser, por ejemplo, liposomas. De manera similar, el adyuvante puede ser 3D-monofosforil lípido A (3D-MPL). Opcionalmente, la composición inmunogénica podría incluir tanto liposomas como 3D-MPL.

La abreviatura 3D-MPL representa el lípido A monofosforilo 3-O-desacilado (también conocido como lípido A monofosforilo 3-de-O-acilado, lípido A 3-O-desacil-4'-monofosforilo, lípido A 3D-monofosforilo y 3D-MLA), un derivado no tóxico del lipopolisacárido que se sabe causa la inducción preferencial de las respuestas inmunes de las células T tipo 1. Garcon et al., EP822831B2 y Moore, Vaccine. 1999; 17:2517-27. 3D-MPL está compuesto por moléculas de lípido A 4'-monofosforilo en las que la posición 3 de la glucosamina terminal reductora se ha desacilado selectivamente. 3D-MPL se describe en el documento GB 2 220 211 (Ribi) como una mezcla de principalmente 3 tipos de lípido A 3-de-O-acilado-4'-monofosforilo con 4, 5 o 6 cadenas de acilo y está fabricado por Corixa dba GlaxoSmithKline. Una forma de 3D-MPL se divulga en el documento WO 92/116556.

Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente hechas de bicapa lipídica. QS-21 es capaz de causar necrosis en el lugar de la inyección, pero esto puede evitarse mediante el uso de formulaciones que contengan una combinación de QS-21 y un esteroil. Los posibles esteroides para uso incluyen  $\beta$ -sitosterol, estigmaesterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol y las composiciones de la invención son las que forman una estructura de liposoma. En general, tales liposomas están compuestos por lípidos neutros, por ejemplo, fosfatidilcolina, que es preferiblemente no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo, fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoilfosfatidilcolina o dilaurilfosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado, ya que esto aumentará la estabilidad de la estructura liposoma-saponina para liposomas compuestos de lípidos saturados. Las formulaciones sugeridas de saponinas con lípidos se describen en el documento WO 1996/033739(A1).

### Términos

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Los términos singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Además, las limitaciones numéricas dadas con respecto a las concentraciones o niveles de una sustancia, como las concentraciones de los componentes del disolvente y las condiciones de reacción, como las temperaturas, las presiones y los tiempos de ciclo, son aproximadas. Por lo tanto, donde se indica que una concentración es al menos (por ejemplo) 22 % en volumen/volumen de acetonitrilo, se pretende que la concentración se entienda que es al menos aproximadamente (o "alrededor de" o "~") 22 % en volumen/volumen acetonitrilo. Del mismo modo, el término "aproximadamente" cuando se usa en referencia a un porcentaje establecido se usa para indicar que el valor dado es aproximado y puede variar en más o menos 5 %.

Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí se pueden usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, a continuación, se describen los procedimientos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y las variaciones tales como "comprender" y "que comprende" implican la inclusión de un compuesto o composición (e.g., saponina, disolvente, componente orgánico) o etapa, o grupo de compuestos o etapas determinadas, pero no con exclusión de cualquier otro compuesto, composición, etapas o grupo estos. La abreviatura, "e.g." se deriva del latín *exempli gratia*, y se usa en este documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por lo tanto, la abreviatura "e.g." es sinónimo del término "por ejemplo".

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos. Se pueden proporcionar términos y explicaciones adicionales en el contexto de la presente divulgación.

El verbo "purificar" (e.g., con respecto a una saponina en una solución) significa separar una saponina en una solución de algunos otros componentes no deseados en la solución (e.g., componentes solubilizantes). Purificar es un término relativo y no requiere que todas las trazas de los otros componentes no deseados se eliminen de la composición. Por ejemplo, una saponina en una solución se considera purificada por el procedimiento aquí divulgado cuando al menos el 90 % de los componentes solubilizantes de la solución se han separado de la saponina.

El término "al menos una saponina en un primer disolvente" se refiere a una mezcla que se dispersa a nivel molecular o micelar de una o más sustancias (e.g., una o varias saponinas), en una o más otras sustancias (e.g., disolvente) que puede (pero no necesita necesariamente) estar compuesto principal o exclusivamente por componentes de fase líquida. El término "disolvente" se refiere a una sustancia, líquida o miscible, mezcla parcialmente miscible o inmiscible de dos o más líquidos, capaces de dispersar completa o parcialmente otra

sustancia, e.g., una saponina, en solución. Un "componente solubilizante" es un componente cuyas moléculas actúan para dispersar otras sustancias, como las saponinas en solución.

El término "molécula" se refiere a los átomos de un solo elemento químico, o de agrupaciones de dos o más átomos de este o diferentes elementos químicos, conectados por enlaces covalentes. Una "molécula orgánica" se refiere a una molécula compuesta de al menos un átomo de carbono. Un "alcohol" es cualquier molécula orgánica en la que un grupo funcional hidroxilo (oxígeno e hidrógeno, -OH) está enlazado a un átomo de carbono. Esta estructura generalmente está conectada covalentemente a otros átomos de carbono o hidrógeno. El término ácido significa cualquier producto químico que sea un donante de protones (es decir, produce iones de hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) cuando se disuelve en agua). Una "base" es cualquier compuesto que sea un receptor de protones (es decir, produce iones de hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) cuando se disuelve en agua). El término acetonitrilo se refiere al compuesto que tiene la fórmula estructural  $\text{CH}_3\text{CN}$ . La medida "volumen/volumen" (abreviado como % vol/vol) se usa para referirse al volumen de un líquido en mL por 100 mL de la solución resultante.

El verbo "reemplazar" (con respecto a reemplazar al menos una porción del componente solubilizante con un disolvente de intercambio) significa sustituir al menos una molécula de un componente solubilizante de un primer disolvente con una o más moléculas diferentes. No todas las moléculas del primer disolvente necesitan sustituirse por moléculas diferentes para que el disolvente se considere reemplazado. Por ejemplo, el reemplazo de más del 40 % de un disolvente es suficiente para constituir un reemplazo. Por ejemplo, el reemplazo de aproximadamente el 75 % de un disolvente es suficiente para constituir un reemplazo.

El término "componente solubilizante" significa cualquier molécula en una solución.

El verbo "eliminar" (con respecto a un disolvente) significa disiparse convirtiéndose en vapor. No todas las moléculas de un disolvente deben estar ausentes para que el disolvente se considere eliminado. Por ejemplo, se considera que el disolvente se ha eliminado de las saponinas purificadas por el procedimiento divulgado aquí cuando al menos el 90 % de los componentes del disolvente se han separado de la saponina. Por ejemplo, la separación de más del 93 % de los componentes del disolvente es suficiente para constituir la eliminación. Por ejemplo, el reemplazo de aproximadamente el 95 % de los componentes del disolvente es suficiente para constituir la eliminación. Por lo tanto, el verbo "permanecer" (con respecto a las moléculas de disolvente en productos de saponina secas) se refiere específicamente a las moléculas de disolvente (e.g., agua y/u otras moléculas de componentes solubilizantes) que persisten en un producto de saponina seca a pesar de los procedimientos de eliminación que se han realizado en el producto de saponina para secarlo o, de lo contrario, deshacerse del disolvente. De hecho, debido a que no es infrecuente que algunas partículas de disolvente a menudo persistan en un producto de saponina seco a pesar de los procedimientos de eliminación que se han realizado para deshacerse de una porción sustancial de disolvente, para que se considere "seco", un producto de saponina no necesita necesariamente estar completamente libre de moléculas de disolvente.

El término "producto de saponina seco depurado con gas" se refiere a un producto de saponina que contiene típicamente menos de 50 ppm de acetonitrilo, menos de 5 % de agua en peso y menos de 0,40 % del principal subproducto de saponina degradado. Estas saponinas son el resultado del proceso de poner en contacto un producto de saponina seco con un gas seco para permitir que las moléculas de disolvente que permanecieron enlazadas dentro del producto de saponina después de la eliminación se dispersen en el gas seco. Como se usa aquí, el término "gas seco" significa cualquier gas que esté sustancial o totalmente libre de moléculas de agua. Un gas seco puede estar compuesto por un solo tipo de moléculas de gas o un material compuesto de dos o más tipos diferentes de moléculas de gas. El verbo "dispersar" (en relación con las moléculas de disolvente) significa difundir, alejar, dispersar o propagar. No todas las moléculas de disolvente que permanecen dentro del producto de saponina después de la eliminación del disolvente deben desenlazarse para que se produzca la dispersión, como se define aquí. Por ejemplo, la difusión mayor que el 10 % de las moléculas de disolvente remanente fuera del producto de saponina seco y en el gas seco es suficiente para constituir la difusión como se define aquí. Por ejemplo, la difusión de aproximadamente el 15 % de las moléculas de disolvente remanentes fuera del producto de saponina seco en el gas seco es suficiente para constituir la difusión.

El término "recipiente de contención semipermeable" se refiere a cualquier estructura capaz de recibir algún volumen de una saponina en una solución, una parte de la cual es permeable a los componentes del disolvente pero impermeable a uno o más solutos (tal como las saponinas) de tal manera que al menos una saponina será retenida por el recipiente de contención, y al menos una partícula de disolvente puede salir de la porción del recipiente que actúa para retener la saponina. Los términos "contenedor" y "recipiente de contención" representan estructuras capaces de contener un volumen de un líquido. El término "no permeable" como se aplica a una membrana o recipiente, se refiere a un material que bloquea sustancialmente el paso de todos los componentes de la solución (como las saponinas y el disolvente) a través de su superficie. El término "totalmente permeable" se refiere a una porción de una membrana o sustancia, que es permeable tanto a los componentes del disolvente como a uno o más componentes del soluto (como las saponinas). Un "canal" es una vía totalmente permeable a través de la cual pueden viajar tanto los componentes del disolvente como los componentes del soluto. El verbo "retenido" (en lo que respecta a las saponinas que no pasan a través de las porciones permeables de los recipientes de contención) significa no viajar a través de la membrana semipermeable y abandonar el recipiente de contención.

El término "membrana semipermeable" se refiere a una membrana o sustancia, permeable a los componentes del disolvente pero impermeable a uno o más solutos (como las saponinas). El término "barrera semipermeable" igualmente se refiere a una membrana o sustancia, permeable a los componentes del disolvente pero impermeable a uno o más solutos (como las saponinas). Una membrana o barrera semipermeable puede facilitar la difusión pasiva de partículas de disolvente dentro o fuera de un primer disolvente si se coloca entre disolventes de diferentes composiciones permitiendo que los componentes del disolvente se muevan hacia abajo de sus gradientes de concentración al cruzar la membrana. Las partículas de disolvente también pueden forzarse a través de membranas o barreras semipermeables, mientras que los parciales de soluto se retienen selectivamente dentro de la membrana o barrera mediante aplicaciones de presión mayor que la presión del ambiente que rodea la membrana o barrera semipermeable a soluciones restringidas por la membrana o aplicaciones de presión de vacío a porciones de la membrana o barrera semipermeable opuestas a soluciones restringidas por la membrana o barrera.

El verbo "sumergido" (en relación con sumergir un recipiente de contención semipermeable que contiene al menos una saponina en el primer disolvente en el disolvente de intercambio) significa que al menos una porción del recipiente de contención semipermeable está simultáneamente en contacto tanto con un primer disolvente como uno de intercambio. No se requiere que todo el recipiente de contención semipermeable entre en contacto con uno o ambos disolventes para que haya ocurrido la inmersión. Tampoco es necesario que toda la porción semipermeable del recipiente de contención esté completamente en contacto con uno o ambos disolventes para que el recipiente se considere "sumergido".

El verbo "separado" (en referencia a los compartimentos del contenedor no permeable separados por una membrana semipermeable) significa que la membrana semipermeable actúa como una barrera de intervención que define un primer y segundo compartimentos del contenedor no permeable. La membrana semipermeable no necesita estar compuesta completamente de material semipermeable para que se considere "que separa" el primer y segundo compartimentos. Por ejemplo, alguna porción de la membrana puede ser no permeable. Además, los compartimentos primero y segundo del contenedor no permeable pueden definirse individualmente únicamente por su separación de otras partes del contenedor por la membrana semipermeable.

El término "equilibrio" (e.g., en relación con un primer disolvente y un disolvente de intercambio separados por una membrana semipermeable que permite alcanzar el equilibrio por difusión) se refiere a cuando las concentraciones de todas las partículas de disolvente capaces de cruzar la membrana semipermeable en dos disolventes separados por una membrana semipermeable se vuelven iguales en el primer disolvente y el disolvente de intercambio. Este equilibrio puede ocurrir de manera pasiva debido a que las partículas de disolvente viajan hacia abajo en sus gradientes de concentración. Sin embargo, también se puede emplear alguna forma de agitación o presión para acelerar este proceso.

El término "vacío" significa una región que tiene una presión de gas reducida en comparación con la presión atmosférica local. Como se usa aquí, "vacío" no significa un espacio totalmente desprovisto de materia. El término "presión negativa" también se refiere a las áreas que tienen una presión más baja que la presión atmosférica local en áreas circundantes.

Como se usa aquí, el término "presión atmosférica" significa la fuerza ejercida sobre la superficie de una unidad de área dada por el peso del aire sobre esa superficie. La presión atmosférica estándar es de aproximadamente 1.000 milibares. Sin embargo, las mediciones precisas de la presión atmosférica son específicas de la ubicación y la elevación y variarán entre los diferentes lugares. Igualmente, la presión atmosférica en un lugar también variará con el tiempo.

La medida "partes por millón" (abreviada como "ppm") se usa aquí para expresar la concentración en volumen o en peso de un contaminante líquido o sólido, respectivamente, por millón de partes de producto de saponina seco. El término "agua en peso", como se usa aquí con respecto a los valores porcentuales, se refiere al porcentaje del peso de un producto de saponina seco que es atribuible a agua.

Una "composición inmunogénica" es una composición de materia adecuada para la administración a un sujeto humano o animal que es capaz de provocar una respuesta inmune específica, e.g., contra un patógeno. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos o epítopos antigénicos. El término "antígeno" es bien conocido por las personas experimentadas. El antígeno puede estar en el contexto de una proteína aislada o fragmento peptídico de una proteína, o puede ser una preparación parcialmente purificada derivada de un patógeno. Alternativamente, el antígeno puede estar en el contexto de un patógeno vivo completo o inactivado. Un antígeno puede ser una proteína, polisacárido, péptido, ácido nucleico, conjugados de proteína-polisacárido, molécula o hapteno que es capaz de provocar una respuesta inmune en un humano o animal. Los antígenos pueden ser derivados, homólogos o sintetizados para imitar, moléculas de virus, bacterias, parásitos, protozoos u hongos. El antígeno también puede ser derivado, homólogo a o sintetizado para imitar moléculas de una célula tumoral o neoplasia. En una realización adicional de la invención, el antígeno se deriva, es homólogo a, o se sintetiza para imitar moléculas de una sustancia implicada en alergia, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, obesidad y dependencia de la nicotina. Típicamente, cuando una composición o vacuna inmunogénica incluye un patógeno vivo, el patógeno se atenúa, es decir, es incapaz de causar enfermedad en un sujeto inmunológicamente competente. En otros casos, una composición o vacuna inmunogénica incluye un patógeno completo inactivado (o

muerto). El patógeno inactivado puede ser un organismo patógeno de tipo salvaje que de otro modo (si no se inactiva) causaría enfermedad en al menos una porción de sujetos inmunológicamente competentes, o una cepa o aislado atenuado o mutante del patógeno.

**Saponinas**

5 Los procedimientos actuales de purificación de QS-21 generalmente involucran dos ciclos consecutivos de liofilización para secar el producto y eliminar el acetonitrilo residual en un grado aceptable. Estos procedimientos actuales no son óptimos porque, además de tomar 14 días para devolver un producto QS-21 purificado, el polvo seco QS-21 producido por estos procedimientos es de consistencia heterogénea. Después de la primera liofilización, el producto de saponina previamente secado se resuspende en agua para la segunda etapa de liofilización. Esto resulta en la heterogeneidad del producto de saponina final porque el producto de saponina secado preliminarmente rara vez se puede disolver completamente. La homogeneidad del producto final es un indicador de la pureza del producto altamente uniforme.

15 El procedimiento divulgado aquí permite la producción de QS-21 purificada en menos de la mitad de la cantidad de tiempo de los procedimientos actuales. Además, como se muestra en la Tabla 1 a continuación, las saponinas purificadas por este procedimiento no retienen más disolvente y agua que los productos de saponina purificados obtenidos utilizando los procedimientos actuales, que típicamente incluyen múltiples etapas de liofilización que pueden tomar el doble de tiempo. Además, el producto de saponina seca, depurado con gas, producido por el procedimiento divulgado es más homogéneo que los productos de saponina seca producidos por los procedimientos actuales.

20 Las saponinas son glucósidos con actividad de superficie, generalmente de origen vegetal y más raramente, otros organismos como las estrellas de mar o los pepinos de mar. Las saponinas están compuestas por una región hidrófila (generalmente compuesta por una o más cadenas de azúcar) en asociación con una región hidrófoba (generalmente compuesta por una estructura esteroide o triterpenoide). Las saponinas frecuentemente poseen actividad hemolítica, actividad adyuvante inmune, la capacidad de formar complejos con colesterol y en algunos casos, actividad antibiótica. Las saponinas también se caracterizan por la capacidad de generar una espuma similar al jabón cuando se agitan en soluciones acuosas. Las saponinas son bien conocidas.

Tabla 1: acetonitrilo residual (en ppm) y agua residual (en % de humedad) en un producto de saponina QS-21 purificado producido por el procedimiento divulgado.

Número de ejecución	Número de muestra	Recolección de muestra	Humedad (%)	ACN (ppm)	QS-21 (%)
1	A	Después del ciclo de liofilización	1,5	19	98,27
		Después del pulso	1,3	5	98,22
	B	Después del ciclo de liofilización	1,6	16	98,24
		Después del pulso	1,3	3	98,25
2		Después del ciclo de liofilización	1,0	44	98,19
	A	Después del pulso	1,5	23	98,13
		Polvo dispensado al contenedor final	1,3	4	98,17
		Después del ciclo de liofilización	1,1	28	98,16
	B	Después del pulso	1,5	13	98,19
		Polvo dispensado al contenedor final	1,7	8	98,24

Las saponinas de glicósidos triterpénicos de ejemplo constituyen hasta el 10 % de la corteza del árbol de Sudamérica Quillaja saponaria Molina. La acción inmunoestimulante de estas saponinas se ha evaluado durante más de 50 años. Se estima que hay cerca de 50 saponinas únicas de Quillaja Saponaria (referidas aquí como "saponinas de Quillaja"). La mayoría tienen la misma base de triterpeno, ácido quillaico, y son 3,28 bisdesmonósidos acetilados (con oligosacáridos unidos a los carbonos 3 y 28 del ácido quillaico). La diferencia entre las saponinas de Quillaja únicas se encuentra principalmente en el patrón de glicosilación o el patrón de acetilación. Hasta la fecha, veintidós saponinas de Quillaja han sido aisladas y ampliamente caracterizadas. Seis de estas, QS-7, QS-17, QS-19, QS-18 y QS-21 muestran una actividad adyuvante significativa en ratones y otros mamíferos. Sin embargo, estas saponinas varían ampliamente en su toxicidad, con QS-18 y QS-19 siendo más tóxicas en dosis más bajas que otras saponinas de Quillaja y QS-21 mostrando baja toxicidad, pero fuerte actividad adyuvante. QS-7 también tiene propiedades de modulación inmune y muy baja toxicidad, pero requiere dosis más altas para la actividad adyuvante. Para una revisión de las diferentes propiedades adyuvantes de las saponinas de Quillaja, véase Kensil CR, et al., Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. *J Immunol.* 146(2):431-7 (1991).

Se ha mostrado que las saponinas de Quillaja inducen una respuesta inmune fuerte de tipo Th1 y Th2 frente a antígenos, así como respuestas moderadas de linfocitos T citotóxicos (CTL) a algunas proteínas. Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 13:1-55 (1996). En consecuencia, las saponinas de Quillaja pueden usarse como adyuvantes en una amplia gama de composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, las saponinas de Quillaja se pueden usar para inducir respuestas Th1 contra patógenos intracelulares y células malignas, así como para suprimir las respuestas alérgicas mediadas por IgE. Sin embargo, dado que el extracto de Quillaja no purificado se compone de una mezcla heterogénea de saponinas con diferencias significativas en su toxicidad, se requiere la separación de saponinas de Quillaja no tóxicas de las otras saponinas más tóxicas para su uso inmunológico seguro.

Los primeros intentos de purificar adyuvantes de saponina de Quillaja se describen por Dalsgaard, *Archiv fuer die gesamte Virusforschung* 44:243 (1974). La preparación de Dalsgaard, el extracto acuoso de saponinas de Quillaja parcialmente purificadas por intercambio de aniones y la filtración en gel ahora está disponible comercialmente bajo el nombre de "Quil-A" y se ha utilizado en vacunas veterinarias desde principios de los años setenta. Aunque parcialmente purificadas, las saponinas de Quil A son considerablemente heterogéneas, mostrando unos 20-25 picos de cromatografía de fase inversa. Una formulación más reciente de Quil A llamada Iscoplep 703 se purifica aún más para que conste solo de 10 picos de cromatografía de fase inversa, excluyendo los componentes más tóxicos.

En una realización particular, el procedimiento divulgado aquí se puede usar para la purificación de la saponina QS-21 de Quillaja. QS-21 constituye una fracción purificada por HPLC de la corteza de árbol de Quillaja Saponaria Molina y se divulga un procedimiento para su aislamiento en la patente de los Estados Unidos No. 5,057,540. La saponina QS-21 de Quillaja tiene una toxicidad particularmente baja, pero induce una fuerte respuesta inmune de tipo Th1 y Th2 frente a antígenos, así como respuestas CTL moderadas a algunas proteínas.

#### **Obtener una saponina en un primer disolvente**

También debe entenderse que es bien conocido para las personas experimentadas en la técnica de la purificación de saponinas, que otros procedimientos cromatográficos se pueden usar para purificar cualquier otra saponina de Quillaja saponaria Molina, así como saponinas de otros organismos, y que estos procesos de purificación pueden también modificarse para obtener mezclas de más de un tipo de saponina en un disolvente (como en Cox et al. 6,352,697 y Kensil et al. '540).

Típicamente, es deseable, en la purificación de saponinas de Quillaja, usar acetonitrilo y agua en el procedimiento de purificación, sin embargo, se puede usar una multitud de otros disolventes para la extracción de saponinas de Quillaja y saponinas de otras especies de plantas, de material vegetal. Por ejemplo, es bien conocido por las personas experimentadas en la técnica de purificación de saponinas, que se pueden usar una gran cantidad de disolventes orgánicos (e.g., acetonitrilo, metanol, cloroformo y alcoholes, solo para nombrar algunos), agua y muchos ácidos y bases para la extracción de saponinas de materiales vegetales, así como composiciones de disolventes orgánicos con ácidos y/o agua para la purificación de saponinas. (véase Kensil et al. '540 uso de metanol y composiciones de metanol y ácido acético, Cox et al. '697 uso de una composición de acetonitrilo y agua acídica, Kensil et al WO 98/24319, uso de una mezcla de cloroformo, metanol, agua y ácido acético). Una concentración de más del 40 % de acetonitrilo es óptima para la elución de QS-21 de una columna de HPLC C8. El acetonitrilo es un disolvente conveniente para usar en el presente procedimiento. Sin embargo, se puede usar cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente capaces de llevar saponinas a solución y/o separar saponinas de otro material vegetal. Igualmente, el porcentaje preciso de acetonitrilo utilizado en los ejemplos se observa únicamente porque es óptimo para la extracción de la columna C8. Una persona experimentada en la técnica de purificación de saponinas igualmente sabría que una variedad de concentraciones de acetonitrilo, o cualquier disolvente utilizado, puede variar dependiendo del sistema de purificación empleado.

### Reemplazo de disolventes

Una vez que se ha obtenido y purificado una saponina en un disolvente, en un grado apropiado para el uso previsto de la saponina, puede ser necesario, dependiendo de las propiedades de congelación del disolvente, reemplazar el disolvente aquel de las saponinas con un disolvente diferente para obtener un producto de liofilización homogéneo. La solubilidad de una saponina en el disolvente cambia a medida que la temperatura disminuye, por lo tanto, la homogeneidad de un producto de liofilización a menudo requiere concentraciones de disolvente más bajas que las que deben usarse para llevarlos a solución o eluirlos fuera de las columnas cromatográficas. Además, algunos disolventes que son miscibles con agua a temperatura ambiente se separan en dominios ricos en agua y ricos en disolventes durante la congelación. Por ejemplo, este efecto se observa con soluciones acuosas de acetonitrilo, por lo que es necesario reducir el nivel de acetonitrilo a menos del 20 % para obtener un producto homogéneo de saponina en la congelación (véase Zarzycki PK et al, *Analyt Sci* 22, 453-456[2006]). Las eluciones de las columnas cromatográficas de fase inversa a menudo requieren concentraciones de acetonitrilo de aproximadamente 30 % a aproximadamente 60 %. Por lo tanto, los procedimientos de purificación en curso pueden dar como resultado una concentración de disolvente superior a la favorable para obtener un producto de liofilización homogéneo.

Hay un número de formas en que se puede realizar el reemplazo de disolvente sobre una saponina en un disolvente. Por ejemplo, se puede utilizar diafiltración, como se detalla anteriormente. La ultrafiltración seguida de la dilución del regulador retenido también es un medio adecuado para el reemplazo del regulador. La diálisis es otro procedimiento posible que se puede usar para reemplazar un disolvente. Sin embargo, como la diafiltración permite que se intercambien volúmenes mucho más altos de disolvente mucho más rápido que la diálisis, la diafiltración se puede usar para realizar el intercambio de disolvente en purificaciones a gran escala.

Un ejemplo de un procedimiento de reemplazo de disolvente para una saponina en solución de disolvente orgánico también se describe en detalle en los ejemplos a continuación. Cuando el procedimiento divulgado aquí se realiza en muestras de saponina en soluciones de acetonitrilo y se pretende purificar aún más la muestra por liofilización, la concentración final de disolvente orgánico después del reemplazo del disolvente es menor que el 21 % en volumen a volumen de acetonitrilo (vol/vol). En ciertas realizaciones, la solución consistiría en menos de 20 % vol/vol de acetonitrilo. En una realización, se obtiene una concentración final de aproximadamente 18 % vol/vol de acetonitrilo porque se requiere una concentración de acetonitrilo menor que el 20 % para obtener un producto homogéneo al congelar (Zarzycki PK et al.). Por lo tanto, un 18 % vol/vol de acetonitrilo es una concentración conveniente para lograr mediante reemplazo de disolvente.

El procedimiento de reemplazo de disolvente descrito en los Ejemplos se incluye solo a modo de ejemplo, y las personas experimentadas en la técnica de purificación de saponinas conocen bien que hay varios procedimientos funcionalmente similares o equivalentes al procedimiento de diafiltración detallado en los ejemplos. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, diálisis y ultrafiltración seguidos de dilución. La diafiltración se ejemplifica aquí porque permite la producción a gran escala de saponinas en disolventes reemplazados y porque la concentración de las especies retenidas se puede controlar fácilmente durante el procedimiento de diafiltración de flujo continuo, proporcionando un procedimiento de reemplazo de disolventes delicado y reproducible. Por lo tanto, la diafiltración es un procedimiento de reemplazo de disolvente conveniente para usar para lograr el reemplazo de disolvente. Sin embargo, como se indicó, se pueden usar ultrafiltración/dilución y diálisis.

### Eliminación de disolventes

Después del reemplazo del disolvente, el disolvente se puede eliminar del producto de saponina generando un producto de saponina seco. La eliminación del disolvente de las saponinas después de los procedimientos cromatográficos se logra mediante liofilización. La liofilización se lleva a cabo en una mezcla de disolvente/soluto al vacío, lo que resulta en la sublimación del disolvente y deja atrás el soluto o solutos secos. Cualquier presión inferior a 100 microbar es probable que sea adecuada. Típicamente, un vacío de al menos aproximadamente 500 mBar es suficiente para promover la sublimación eficiente de un disolvente. Aunque la presión puede reducirse aún más, hacerlo tiene poco efecto sobre la tasa de secado, y bajo condiciones de muy baja presión, la eficiencia de la sublimación disminuye.

Aunque la eliminación del disolvente se podría realizar simplemente colocando una muestra líquida en una cámara de vacío, debido a la formación de espuma como se indicó anteriormente, la pérdida de producto y la disminución de la homogeneidad del producto pueden resultar del uso de tal procedimiento. Para evitar la formación de espuma, primero debe congelarse una saponina en un disolvente y luego se puede eliminar el disolvente por sublimación al vacío, un proceso llamado liofilización o secado por congelación. En general, se utiliza una tasa de enfriamiento relativamente lenta de entre 0,1 °C y 1,0 °C/minuto para promover el desarrollo de grandes cristales de hielo que propician la migración de vapor.

Además, un procedimiento conveniente para la liofilización de soluciones de saponina es utilizar una bandeja desechable LYOGUARD™ de la marca Gore. Estas bandejas de liofilización de uso único y autoclavables comprenden una bandeja químicamente inerte cubierta con una membrana semipermeable que permite que pase el vapor, pero no el líquido y por lo tanto protege el producto de la contaminación externa durante el uso. Las bandejas LYOGUARD™ son adecuadas para aplicaciones de secado por congelación a gran escala de saponinas.

Un ejemplo de un procedimiento de liofilización que se puede realizar en una saponina en un disolvente reemplazado se describe en detalle en ejemplos a continuación.

Por ejemplo, es bien conocido por las personas experimentadas en la técnica de la purificación de saponinas que la evaporación por calor puede usarse para eliminar partículas de disolvente de solutos no volátiles, como las saponinas, donde se aplica calor a una solución, por encima del punto de ebullición de los componentes del disolvente líquido. Igualmente, la evaporación del disolvente en forma de evaporación rotatoria es bien conocida por las personas experimentadas en la técnica de la purificación de saponinas.

La evaporación rotatoria implica la evaporación del disolvente de los solutos, colocando las mezclas de soluto y disolvente en un recipiente que luego se gira sobre calor mientras simultáneamente se mantiene bajo vacío a través de un tubo que también actúa como un condensador. El disolvente vaporizado sale del matraz a través del tubo de conexión y se recolecta a medida que se vuelve a condensar en la sección del condensador. Todas las partículas de soluto no volátiles permanecen en el matraz. Aunque la evaporación rotatoria se usa comúnmente para recuperar solutos no volátiles eluidos después de la separación cromatográfica, es probable que este procedimiento no sea óptimo para purificaciones de saponina debido a la tendencia de las saponinas a producir espuma cuando se mezcla o experimenta cambios de temperatura y presión. Por lo tanto, la evaporación rotativa puede conducir a la pérdida de producto a través de la línea de vacío/condensador. La exposición controlada al calor también puede producir resultados subóptimos para la evaporación de disolventes de las saponinas porque el calentamiento de la muestra puede resultar en una degradación significativa del producto. Además, cualquier procedimiento que aumente la longitud de tiempo que tarda la purificación de las saponinas aumenta la proporción de subproductos de saponinas degradados que pueden acumularse en la muestra.

#### Depuración con gas

Opcionalmente, luego de la eliminación del disolvente de la saponina en el disolvente reemplazado, se pueden eliminar aún más de las moléculas del disolvente, del producto de saponina seco, mediante la exposición a un gas seco seguido de ciclos de vacío que producen una saponina seca limpiada con gas (aquí, después de este procedimiento se denomina "limpieza con gas"). Este procedimiento actúa para desorber cualquier producto parcial de disolvente enlazado ligeramente del producto de saponina seco. Si bien la mayoría de los procedimientos de eliminación de disolventes, como la liofilización, la evaporación rotatoria y la exposición al calor, se pueden emplear para eliminar una porción sustancial de partículas de disolvente de soluciones que comprenden saponinas en un disolvente, con frecuencia, algunas partículas de disolvente persistirán o permanecerán pegadas dentro del producto final. Esto es particularmente probable que ocurra donde el componente solubilizante usado sea más pesado que otros componentes disolventes, ya que estos se difundirán del producto de saponina seco más lentamente que otros componentes disolventes más livianos. Una limpieza de gas permite que estas partículas atrapadas se dispersen lejos y fuera del producto de saponina seco.

Típicamente, aunque no necesariamente, el producto de saponina seco se transferirá a una cámara de vacío limpia al inicio del ciclo de pulso. El producto de saponina seco se expone luego a un ciclo que consiste en cambiar las condiciones de la cámara de vacío a condiciones ricas en nitrógeno. Opcionalmente, un producto de saponina seca puede exponerse a más de un ciclo de este tipo. Por ejemplo, se puede usar de uno a diez ciclos de este tipo. Opcionalmente, sin embargo, se pueden usar más de diez ciclos de pulso. Aunque, típicamente, se realizan entre cuatro y ocho ciclos de este tipo. Por ejemplo, en una realización, se realizan siete ciclos de este tipo. Opcionalmente, este ciclo se puede realizar a una temperatura de anaquel superior a 20 grados centígrados. Por ejemplo, se puede usar una temperatura de anaquel mayor a 30 grados centígrados. En algunas realizaciones, este ciclo se realiza a 34 grados centígrados.

Inicialmente, el producto de saponina seco en un vacío limpio se expone a condiciones de vacío, como una presión de aproximadamente 50 microbar. Aunque la presión puede reducirse aún más, hacerlo tiene poco efecto sobre la eficacia de la limpieza del gas. Igualmente, cualquier presión inferior a 100 microbar es adecuada. Una vez que se alcanza el punto de ajuste de presión deseado, el vacío debe mantenerse durante al menos 20 minutos. Típicamente, la presión de vacío se mantendrá durante aproximadamente 30 minutos. Luego de la aplicación de la presión de vacío, la presión de vacío en la cámara se libera con un gas seco como nitrógeno en lugar de aire ambiental. Esto evita cualquier absorción adicional en la muestra, de agua del aire en forma de humedad. Además, un gas completamente seco tendrá más espacio libre en el que puede ocurrir la desorción de partículas de la muestra. Se debe ingresar gas seco en el sistema hasta que se alcance una presión de más de 700 microbar. Típicamente se usa una presión de alrededor de 800 microbar. Sin embargo, cualquier presión por encima de la presión atmosférica es adecuada. Estas condiciones se mantienen durante unos 5 minutos. Esto representa un ciclo de pulso. Típicamente, siete de estos ciclos de pulso se realizan en un lote, seguido de la descarga del producto.

Un procedimiento de ejemplo de ciclo de pulso también se describe y se detalla en los ejemplos a continuación. Debe entenderse que el procedimiento descrito en los ejemplos se incluye solo a modo de ejemplo, y que cualquier gas libre de agua o cualquier combinación de dos o más gases libres de agua podría utilizarse en lugar de nitrógeno. También debe entenderse que algunas variaciones en otros parámetros del procedimiento señalados, como la temperatura, la presión, la duración del gas y la exposición a vacío, podrían no obstante generar productos de saponina secados con gas de calidad idéntica o similar.

QS-21 purificado producido por los procedimientos divulgados

La presente divulgación también se relaciona con QS-21 altamente purificada producida de acuerdo con los procedimientos divulgados aquí. La saponina de Quillaja, QS-21 purificada por estos procedimientos es más homogénea que la producida por otros procedimientos debido a la reducción a uno del número de liofilizaciones requeridas. Además, a pesar de que solo requiere una liofilización y la mitad del tiempo de los procedimientos actuales de purificación de QS-21, el QS-21 purificado con los procedimientos actuales puede contener menos de 50 ppm de acetonitrilo y menos de 2 % de agua en peso. Por lo tanto, el procedimiento actual permite la producción de un producto de QS-21 purificado que es más homogéneo y comprende menos disolvente residual que el QS-21 purificado que se puede obtener a partir de procedimientos existentes en menos tiempo del que requieren los procedimientos existentes.

Adicionalmente, dado el gran valor farmacológico de QS-21 que se deriva de su baja toxicidad y capacidad para inducir fuertes respuestas inmunes Th1 y Th2 frente a antígenos, así como respuestas moderadas de linfocitos T citotóxicos (CTL) a algunas proteínas, la divulgación actual también se relaciona con el uso de las saponinas QS-21 altamente purificadas obtenidas por los procedimientos divulgados como un adyuvante en composiciones inmunogénicas. Además, se puede evitar la posible necrosis que puede ser causada por QS-21 en el lugar de la inyección cuando se usa QS-21 como adyuvante, con el uso de formulaciones que contengan colesterol. La presente divulgación se relaciona además con el uso de QS-21 purificada por los procedimientos divulgados en combinación con colesterol, otros lípidos y/o 3D-MPL.

**Ejemplos**20 Purificación de saponina QS-21 de material vegetal:

Una solución de QS-21 purificada en un disolvente que comprende acetonitrilo se puede preparar a partir de un extracto acuoso de Quillaja saponaria usando procedimientos bien conocidos en la técnica anterior (e.g., los documentos US6231858 o US6524584).

Intercambio de disolventes

Después de la purificación del material vegetal, se realizó un intercambio de disolvente. La solución de QS-21 a una concentración >20 g/L de QS-21 y en una mezcla de disolventes que consistía en 60 % en volumen/volumen de acetonitrilo, agua al 40 %, se diafiltró usando una unidad de ultrafiltración (presión transmembrana de aproximadamente 2,5 bar, temperatura ambiente) a través de una membrana de límite de peso molecular de 1.000 Dalton, contra 4 volúmenes de un disolvente que consiste en aproximadamente 18 % en volumen/volumen de acetonitrilo y agua al 82 %. (Aquí se usó celulosa regenerada 1.000 Da, de Millipore Pellicon 2 P2PLA). Luego se recolectó el material retenido, se analizó el contenido de QS-21 mediante análisis de HPLC de fase inversa y se diluyó hasta una concentración final de QS-21 de aproximadamente 18 gramos por litro agregando un disolvente que consiste en aproximadamente 18 % en volumen/volumen de acetonitrilo y agua al 82 %.

Eliminación de disolventes

Después del intercambio de disolvente, se realizó la eliminación del disolvente. La solución de QS-21 se liofilizó congelando el entrepaño de liofilización a -56 °C, realizando un secado primario a una temperatura de entrepaño de -45 °C y 570 µbar durante 15 horas, y un segundo segmento de secado primario a una temperatura de entrepaño de -15 °C y 200 µbar durante 64 horas. A esto le siguió una etapa de secado secundario a una temperatura de 34 °C y 200 µbar durante 10 horas, un segmento de secado secundario posterior a una temperatura de 34 °C y 100 µbar durante 12 horas y un tercer segmento de secado secundario a una temperatura de entrepaño de 34 °C y 50 µbar durante 12 horas.

Ciclo de pulso

Tras la evaporación del disolvente se realizó el ciclo de pulso. El QS-21 liofilizado se transfirió a una cámara de vacío limpia, y se realizó un ciclo que consiste en cambiar las condiciones de la cámara de vacío (30 min, 50 µbar) a condiciones ricas en nitrógeno (5 min, 800 mbar) 7 veces a una temperatura de entrepaño de 34 °C para desorber cualquier acetonitrilo suelto fuera del QS-21 liofilizado.

Siguiendo las técnicas descritas anteriormente en los ejemplos de acuerdo con los procedimientos divulgados, se produjo un producto de saponina seca limpiada con gas.

La Tabla 1, arriba, representa el contenido de agua residual y acetonitrilo en un producto de saponina producido por los procedimientos divulgados (Número de Ejecución 1, Muestra A y B). La cantidad de acetonitrilo residual en la muestra se determinó por HPLC. La cantidad de agua residual en la muestra se determinó mediante la determinación de Karl Fisher. Ambas muestras examinadas contenían menos de 50 ppm de acetonitrilo y menos de 2 % de contenido de agua residual.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de purificación de al menos una saponina en una solución que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar al menos una saponina en un primer disolvente que comprende un componente solubilizante;
  - 5 (b) reemplazar al menos una porción del componente solubilizante con un disolvente de intercambio por uno o más de: diafiltración, ultrafiltración o diálisis, produciendo así un disolvente reemplazado;
  - (c) eliminar el disolvente reemplazado por liofilización, para producir un producto de saponina seco que comprende al menos una saponina;
- 10 en el que el primer disolvente comprende al menos una saponina parcialmente purificada seleccionada del grupo QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21; y
 

el primer disolvente comprende al menos 22 % en volumen/volumen de acetonitrilo; y

el solvente reemplazado no comprende más del 21 % en volumen/volumen de acetonitrilo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el disolvente que comprende un componente solubilizante de la etapa (a) dispersa total o parcialmente la al menos una saponina en el disolvente.
- 15 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer disolvente comprende entre 30 % y 65 % en volumen/volumen de acetonitrilo, entre 40 % y 62 % en volumen/volumen de acetonitrilo o entre 58 % y 62 % en volumen/volumen de acetonitrilo.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende reemplazar la al menos una porción del componente solubilizante intercambiando un volumen idéntico o no idéntico del primer disolvente
 

20 con un disolvente de intercambio.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el disolvente reemplazado comprende entre 15 % y 21 % en volumen/volumen de acetonitrilo.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende reemplazar la al menos una porción del componente solubilizante en un sistema que comprende un recipiente de contención
 

25 semipermeable.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el recipiente de contención semipermeable es selectivamente permeable de modo que cuando el al menos un componente de disolvente pasa a través de la porción permeable del recipiente y se retendrá al menos una saponina.
8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que el recipiente de contención semipermeable comprende una
 

30 única membrana semipermeable.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la sustitución de la al menos una porción del componente solubilizante se logra sumergiendo el recipiente de contención semipermeable que comprende la al menos una saponina y un primer disolvente en un disolvente de intercambio y permitiendo que los disolventes se separen por la membrana para alcanzar el equilibrio por difusión.
- 35 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que el recipiente de contención semipermeable comprende un canal que está rodeado por una estructura semipermeable.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el canal es completamente permeable a la solución que incluye al menos una saponina en un disolvente.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el canal constituye el interior del recipiente de contención, y cualquier porción de la estructura semipermeable que no está en contacto con el canal constituye el exterior del recipiente de contención.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende mover la al menos una saponina y un primer disolvente a través del canal del recipiente de contención a una presión positiva en relación con el exterior del recipiente, de manera que al menos un componente de la solución es forzado a través de la porción semipermeable del recipiente de contención.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, que comprende reemplazar al menos una porción del componente solubilizante con un disolvente de intercambio agregando el disolvente de intercambio al interior del recipiente de contención.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-14, en el que el recipiente de contención semipermeable comprende un contenedor no permeable que comprende un primer compartimento y un segundo compartimento separados por una membrana semipermeable.
- 5 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, que comprende colocar la al menos una saponina y un primer disolvente en el primer compartimento del recipiente de contención.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, que comprende hacer que el primer compartimento del recipiente de contención sea una presión positiva con respecto al segundo compartimento, de manera que al menos un componente de la solución se fuerce a través de la porción semipermeable del recipiente de contención.
- 10 18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, que comprende reemplazar al menos una porción del componente solubilizante con un disolvente de intercambio al agregar un disolvente de intercambio al primer compartimento del recipiente.
19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la liofilización se realiza en bandejas desechables LYOGUARD™ de la marca Gore.
- 15 20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende repetir la etapa de eliminación al menos una vez.
21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer disolvente comprende al menos QS-21 parcialmente purificado.