

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 708**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/IB2012/054805**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13038375**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12783302 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2755683**

54 Título: **Procedimientos de fabricación de glucoconjugados de sacárido-proteína**

30 Prioridad:

14.09.2011 US 201161534751 P

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

25.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SAUL, ALLAN y
MICOLI, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 732 708 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

Procedimientos de fabricación de glucoconjugados de sacárido-proteína

Campo de la invención

5 Esta invención está en el campo de la conjugación de sacáridos, particularmente el dominio núcleo del lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas, a portadores para formar glucoconjugados. Los glucoconjugados son útiles para la inmunización.

Técnica anterior

10 Los sacáridos de bacterias han sido usados durante muchos años en vacunas. Aunque los sacáridos son antígenos T-independientes, sin embargo, son escasamente inmunogénicos. La conjugación con un portador puede convertir los antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes, aumentando de ese modo las respuestas memoria y permitiendo que se desarrolle inmunidad protectora. Por lo tanto, la mayoría de las vacunas de sacárido eficaces están basadas en glucoconjugados, y la vacuna de conjugado prototipo era frente a *Haemophilus influenzae* tipo b ("Hib") [por ejemplo, véase el capítulo 14 de la ref. 64].

15 Las bacterias Gram-negativas están rodeadas por una membrana exterior que contiene lipopolisacárido. Los lipopolisacáridos son un grupo diverso de moléculas que actúan como endotoxinas y suscitan respuestas inmunes fuertes en mamíferos. Cada lipopolisacárido comprende tres partes: un O-antígeno (también referido como el polisacárido O-específico u O-polisacárido), un dominio núcleo, y un dominio de lípido A. Los anticuerpos frente al O-antígeno de una bacteria Gram-negativa pueden conferir protección frente a infección por esa bacteria. Por lo tanto, se ha previsto que las vacunas contienen O-antígenos conjugados con proteínas portadoras. Por ejemplo, se han
20 propuesto vacunas conjugadas basadas en O-antígeno para diversas *Salmonellae* (por ejemplo, los serovares *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Paratyphi A de *Salmonella enterica* in las ref. 1 y 2); especies de *Shigella* [ref. 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9]; y *Escherichia coli* [ref. 10 y 11]. En estas vacunas, el O-antígeno está unido al dominio núcleo del lipopolisacárido de longitud completa (es decir, el polisacárido conjugado es un lipopolisacárido sin su dominio de lípido A). El polisacárido se conjuga con el portador por su dominio núcleo. Este dominio núcleo puede autoinducir
25 anticuerpos protectores y, por lo tanto, se ha previsto que las vacunas conjugadas contienen un dominio núcleo que no está unido a un O-antígeno [ref. 12].

Se conocen diversos procedimientos para la conjugación de polisacáridos que contienen dominio núcleo con una proteína portadora. Algunos procedimientos implican activación aleatoria de la cadena de polisacárido (por ejemplo, con bromuro de cianógeno (CNBr) o tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP)) antes de la
30 conjugación por un enlazador (véase, por ejemplo, las ref. 1 y 2). Otros procedimientos son más selectivos, implicando un residuo específico sobre la cadena (por ejemplo, el terminal de ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico (KDO) del dominio núcleo). Por ejemplo, los procedimientos en la referencia 13 implican aminación reductiva entre el grupo carbonilo en el terminal de KDO con enlazador de ácido adípico dihidrazida (ADH). Las reacciones que implican la aminación reductiva son generalmente muy lentas, por ejemplo, la etapa del día 7 en la ref. 13. En la ref. 9 se describe otro procedimiento selectivo, implicando esta vez acoplamiento por el grupo carboxilo en KDO usando 1-
35 etil-1-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y ADH. En estos procedimientos no selectivos y selectivos, la reacción posterior con el portador generalmente tiene lugar usando EDAC, la cual activa los grupos carboxilo en la proteína para la reacción con el enlazador. Esta activación de EDAC puede dar como resultado la activación del grupo carboxilo en la subunidad de KDO, conduciendo a reacciones secundarias indeseadas. La activación con
40 EDAC también puede dar como resultado el entrecruzamiento de la proteína portadora, debido a que los grupos carboxilo activados en la proteína pueden reaccionar con grupos amino primario en la proteína en lugar de en el enlazador.

En consecuencia, queda una necesidad de maneras adicionales y mejores de preparación de conjugados, particularmente del dominio núcleo del lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas.

Divulgación de la invención

La invención se basa en procedimientos de conjugación que se pueden usar en lugar de los procedimientos de conjugación de la técnica anterior. Estos procedimientos pueden ser más rápidos de realizarse que los procedimientos de la técnica anterior, particularmente aquellos procedimientos que implican la aminación reductiva. Los procedimientos tampoco requieren del uso de EDAC, lo cual evita reacciones secundarias indeseadas. En el
50 desarrollo de estos procedimientos, los inventores han encontrado maneras de purificación de compuestos intermediarios que no requieren el uso de compuestos tóxicos. En consecuencia, los procedimientos se pueden llevar a cabo de forma más segura. Los conjugados resultantes pueden tener propiedades inmunológicas diferentes, preferentemente mejoradas, en comparación con los conjugados de la técnica anterior.

Primer aspecto de la invención

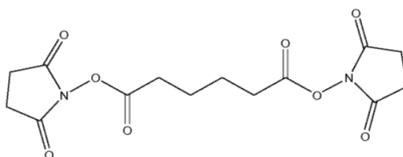
55 En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un conjugado de un polisacárido y una molécula portadora, que comprende las etapas de: (a) acoplar el polisacárido a un enlazador, para formar un

intermediario polisacárido-enlazador en el que el terminal libre del enlazador es un grupo éster; y (b) hacer reaccionar el grupo éster con un grupo amino primario en la molécula portadora, para formar un conjugado de polisacárido-enlazador-molécula portadora en el que el enlazador se acopla a la molécula portadora por un enlace amida, en el que la etapa (a) tiene lugar con un enlazador adicional que se usa para someter a derivatización el polisacárido antes del acoplamiento al enlazador y en el que el enlazador adicional tiene un grupo amino primario en ambos terminales y el polisacárido se acopla al enlazador adicional usando un grupo carbonilo en el terminal reductor del polisacárido mediante un procedimiento que comprende dos etapas: (a₁) hacer reaccionar el grupo carbonilo con uno de los grupos amino primario en el enlazador adicional mediante aminación reductiva para formar un compuesto polisacárido-enlazador adicional en el que el polisacárido se acopla al enlazador adicional por un enlace C-N; y (a₂) hacer reaccionar el terminal libre del enlazador adicional con el enlazador. A diferencia de los procedimientos de conjugación usados en las ref. 1, 2 y 13, el procedimiento no requiere de activación de la molécula portadora con EDAC, evitando de ese modo reacciones secundarias indeseadas. La invención también proporciona el conjugado obtenido u obtenible mediante este procedimiento.

Etapa (a) del primer aspecto de la invención

En la etapa (a) de este primer aspecto de la invención, el polisacárido se acopla a un enlazador para formar un intermediario polisacárido-enlazador en el que el terminal libre del enlazador es un grupo éster. Por lo tanto, el enlazador es uno en el que al menos un terminal es un grupo éster. El otro terminal se selecciona de manera que puede reaccionar con el polisacárido para formar el intermediario polisacárido-enlazador, tal como se explica más adelante.

Se desvelan procedimientos en los que el acoplamiento en la etapa (a) tiene lugar directamente. En estos procedimientos, el polisacárido generalmente se acopla al enlazador usando un grupo amino primario en el polisacárido. En estos procedimientos, el enlazador generalmente tiene un grupo éster en ambos terminales. Esto permite que el acoplamiento tenga lugar mediante la reacción de uno de los grupos éster con el grupo amino primario en el polisacárido mediante sustitución de ácido nucleófilo. La reacción da como resultado un intermediario polisacárido-enlazador en el que el polisacárido se acopla al enlazador por un enlace amida. En estos procedimientos, por lo tanto, el enlazador es un enlazador bifuncional que proporciona un primer grupo éster para reaccionar con el grupo amino primario en el polisacárido y un segundo grupo éster para reaccionar con el grupo amino primario en la molécula portadora. Por ejemplo, se puede usar un enlazador bifuncional de fórmula X₁-L-X₂, en el que X₁ es un grupo éster que puede reaccionar con el grupo amino primario en el polisacárido; X₂ es un grupo éster que puede reaccionar con el grupo amino primario en la molécula portadora; y L es un resto de unión en el enlazador. Los grupos L típicos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀), particularmente -(CH₂)₄-. Los enlazadores homobifuncionales de fórmula X-L-X son particularmente adecuados, en los que los dos grupos X son iguales uno a otro y son capaces de reaccionar con ambos grupos amino primario; y en los que L es un resto de unión en el enlazador. Un grupo X típico es N-oxisuccinimida. L generalmente tiene la fórmula L¹-L²-L¹, en el que L¹ es carbonilo. Los grupos L² típicos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀), particularmente -(CH₂)₄-. Un enlazador típico es por tanto N-hidroxisuccinimida diéster de ácido adípico (SIDEA), y los inventores han encontrado que este compuesto es particularmente adecuado como enlazador:



En realizaciones de la invención, el acoplamiento en la etapa (a) tiene lugar indirectamente, es decir, con un enlazador adicional que se usa para derivatización del polisacárido antes del acoplamiento al enlazador. El polisacárido se acopla al enlazador adicional usando un grupo carbonilo en el terminal reductor del polisacárido. El acoplamiento en la etapa (a) comprende dos etapas: (a₁) hacer reaccionar el grupo carbonilo con el enlazador adicional; y (a₂) hacer reaccionar el terminal libre del enlazador adicional con el enlazador. El enlazador adicional tiene un grupo amino primario en ambos terminales, permitiendo de ese modo que la etapa (a₁) tenga lugar mediante hacer reaccionar los grupos amino primario con el grupo carbonilo en el polisacárido mediante aminación reductiva. Se usa un grupo amino primario que es reactivo con el grupo carbonilo en el polisacárido. Los inventores han encontrado que un grupo hidrazida (especialmente -C(=O)NHNH₂) o hidroxilamino (-OHNH₂) es adecuado. El mismo grupo amino primario generalmente está presente en ambos terminales del enlazador adicional. La reacción da como resultado un intermediario polisacárido-enlazador adicional en el que el polisacárido se acopla al enlazador adicional por un enlace C-N.

El procedimiento de la invención da como resultado un intermediario polisacárido-enlazador adicional después de la etapa (a₁). El terminal libre del enlazador adicional es un grupo amino primario. La etapa (a₂) tiene lugar usando este grupo amino primario de la misma manera que se usa el grupo amino primario en los procedimientos desvelados que implican el acoplamiento directo anteriormente descrito, con el mismo enlazador, etc.

Esta segunda etapa da como resultado un intermediario polisacárido-enlazador en el que el polisacárido se acopla al enlazador por el enlazador adicional, dicho enlazador adicional se acopla al enlazador por un enlace amida. El enlazador adicional en estas realizaciones indirectas es un enlazador bifuncional que proporciona un primer grupo amino primario para reaccionar con el grupo carbonilo en el polisacárido y un segundo grupo amino primario para reaccionar con uno de los grupos éster en el enlazador. Por ejemplo, se puede usar un enlazador bifuncional de fórmula Y_1-L-Y_2 como enlazador adicional, en el que Y_1 comprende un grupo amino primario que puede reaccionar con el grupo carbonilo en el polisacárido; Y_2 comprende un grupo amino primario que puede reaccionar con uno de los grupos éster en el enlazador; y L es un resto de unión en el enlazador adicional. Los grupos L típicos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$), particularmente $-(CH_2)_4-$. Enlazadores homobifuncionales de fórmula Y-L-Y son particularmente adecuados como enlazador adicional, en los que dos grupos Y son iguales uno a otro y son capaces de reaccionar con tanto el grupo carbonilo como el grupo éster; y en los que L es un resto de unión en el enlazador adicional. Un grupo Y típico es un grupo -NHNH₂. L generalmente tiene la fórmula $-L^1-L^2-L^1-$, en el que L^1 es carbonilo. Los grupos L^2 típicos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$), particularmente $-(CH_2)_4-$. Por tanto, un enlazador adicional típico es ácido adípico dihidrazida (ADH), y los inventores han encontrado que este compuesto es particularmente adecuado como enlazador adicional para la invención. Sin embargo, se pueden usar enlazadores adicionales más cortos, y los inventores han encontrado que la carbodihidrazina (CDH, es decir, Y-L-Y, en la que Y es -NHNH₂ y L es carbonilo) es también particularmente adecuada como enlazador adicional para la invención.

20 Etapa (b) del primer aspecto de la invención

En la etapa (b), el grupo éster en el terminal libre del enlazador en el intermediario polisacárido-enlazador reacciona con un grupo amino primario en la molécula portadora. La reacción tiene lugar mediante sustitución de ácido nucleófilo para formar un conjugado de polisacárido-enlazador-molécula portadora en el que el enlazador se acopla a la molécula portadora por un enlace amida.

25 Entre la etapa (a) y la etapa (b), el enlazador no reaccionado se puede separar del intermediario polisacárido-enlazador. Preferentemente, esta separación se lleva a cabo mediante el procedimiento del tercer aspecto de la invención, el cual se describe en detalle más adelante.

Los conjugados con un una relación de polisacárido:proteína (p/p) de entre 1:10 (es decir, proteína en exceso) y 10:1 (es decir, exceso de polisacárido) se pueden producir mediante los procedimientos de la invención, dependiendo de los pesos moleculares del polisacárido y la molécula portadora. Por ejemplo, los conjugados pueden tener exceso de sacárido, por ejemplo, relaciones de 10:1 a 1:1, con relaciones mayores que 1,5:1 que es típica para el O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi* acoplado a CRM₁₉₇. Las relaciones entre 8:1 y 1,5:1 son de particular interés, más específicamente las relaciones entre 6:1 y 2:1. Por el contrario, los conjugados fabricados mediante procedimientos de la técnica anterior tienden a tener exceso de proteína, por ejemplo, entre 1:17 y 1:1,4 en la referencia 13. Los inventores han encontrado que relaciones entre 6:1 y 2:1, particularmente entre 3:1 y 4:1, son útiles para conjugados que contienen O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi* y CRM₁₉₇. Estos conjugados se pueden fabricar eficazmente y muestran inmunogenicidad similar a conjugados que contienen mayores cantidades de polisacárido (por ejemplo, relaciones entre 5:1 y 6:1). En términos de relación polisacárido:proteína (mol/mol), los procedimientos de la invención permiten que más de una cadena de polisacárido se conjugue con cada molécula portadora, así relaciones mayores que 1:1 son típicas.

Las composiciones pueden incluir una pequeña cantidad de portador libre [14]. Cuando una proteína portadora dada está presente en forma tanto libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferentemente no más del 5 % de la cantidad total de la proteína portadora en la composición en conjunto, preferentemente presente en menos del 2 % en peso, y más preferentemente presente en menos del 1 % en peso.

45 Después de la conjugación, se pueden separar los polisacáridos libres y conjugados. Hay muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), filtración de flujo tangencial, cromatografía de exclusión por tamaño, etc. [véase también las ref. 15 y 16, etc.].

El conjugado es preferentemente soluble en agua y/o en un tampón fisiológico.

Segundo aspecto de la invención

50 En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento de aminación reductiva de un grupo carbonilo en el terminal reductor de un polisacárido, en el que el polisacárido comprende un dominio núcleo y un O-antígeno de un lipopolisacárido de una bacteria Gram-negativa unido al dominio núcleo, en el que la aminación reductiva se lleva a cabo a un pH entre 4 y 5. La aminación reductiva se puede llevar a cabo a un pH entre 4,1 y 4,9, tal como entre 4,2 y 4,8, por ejemplo, entre 4,3 y 4,7, tal como un pH entre 4,4 y 4,6. Los inventores han encontrado que este pH relativamente bajo permite que la reacción se lleve a cabo rápidamente (por ejemplo, en 1 hora a 30 °C) en comparación con la reacción del día 7 en la ref. 13.

Preferentemente la aminación reductiva se lleva a cabo según el procedimiento del primer aspecto de la invención, específicamente la etapa (a₁) de la realización que implica el acoplamiento indirecto anteriormente descrito.

La aminación reductiva puede comprender hacer reaccionar el grupo carbonilo con el enlazador adicional anteriormente descrita. El enlazador adicional generalmente tiene un grupo amino primario en ambos terminales, permitiendo de ese modo que la aminación reductiva tenga lugar mediante hacer reaccionar uno de los grupos amino primario con el grupo carbonilo. Se usa un grupo amino primario que es reactivo con el grupo carbonilo en el polisacárido. Los inventores han encontrado que es adecuado una hidrazida (especialmente $-C(=O)NHNH_2$) o grupo hidroxilamino ($-ONH_2$). El mismo grupo amino primario generalmente está presente en ambos terminales del enlazador adicional. La reacción da como resultado un intermediario polisacárido-enlazador adicional en el que el polisacárido está acoplado al enlazador adicional por un enlace C-N.

El enlazador adicional puede ser en particular un enlazador bifuncional de fórmula Y_1-L-Y_2 , en el que Y_1 comprende un grupo amino primario que puede reaccionar con el grupo carbonilo en el polisacárido; Y_2 comprende un segundo grupo amino primario reactivo que se puede unir a la molécula portadora, tal como, por ejemplo, un grupo amino primario o un grupo $-SH$; y L es un resto de unión en el enlazador adicional. Los grupos L típicos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$), particularmente $-(CH_2)_4-$. Los enlazadores homobifuncionales de fórmula $Y-L-Y$ son particularmente adecuados como enlazador adicional, en los que dos grupos Y son iguales uno a otro y son capaces de reaccionar con el grupo carbonilo; y en los que L un resto de unión en el enlazador adicional. Un grupo X típico es un grupo $-NHNH_2$. L generalmente tiene la fórmula $-L'-L^2-L'-$, en el que L' es carbonilo. Los grupos L^2 típicos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$), particularmente $-(CH_2)_4-$. Por tanto, un enlazador adicional típico es ácido adípico dihidrazida (ADH), y los inventores han encontrado que este compuesto es particularmente adecuado como enlazador adicional para la invención. Sin embargo, se pueden usar enlazadores adicionales más cortos, y los inventores han encontrado que la carbodihidrazina (CDH, es decir, $Y-L-Y$, en la que Y es $-NHNH_2$ y L es carbonilo) es también particularmente adecuada como enlazador adicional para la invención.

Este procedimiento es particularmente adecuado cuando el polisacárido es el O-antígeno-núcleo de un lipopolisacárido de *S. Paratyphi A*, *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*.

La aminación reductiva es una técnica convencional en química orgánica, y se ha usado mucho en la producción de conjugados de polisacáridos capsulares para el uso de vacuna, incluyendo O-antígeno-núcleo [13]. En el segundo aspecto de la invención, un grupo carbonilo en el polisacárido reacciona con un grupo amino primario, por ejemplo, en el enlazador adicional anteriormente descrito. Esta etapa también tiene lugar en el procedimiento del primer aspecto de la invención, específicamente la etapa (a_1) de las realizaciones que implica el acoplamiento indirecto anteriormente descrito. La aminación reductiva se puede conseguir de forma conveniente combinando el polisacárido con el grupo amino primario en presencia de un agente reductor apropiado (por ejemplo, cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio $NaBH_3CN$; borano-piridina; triacetoxiborohidruro de sodio; resina de intercambio de borohidruro, etc.). El experto sería capaz de identificar las condiciones adecuadas para la aminación reductiva. Por ejemplo, los inventores han encontrado que ese tratamiento del polisacárido (O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi*, *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*) a 40 mg/ml en acetato de sodio 100 mM a pH 4,5 con enlazador adicional (ADH o CDH) a una relación de polisacárido:enlazador adicional 2:1 (p/p) y $NaBH_3CN$ a una relación de polisacárido: $NaBH_3CN$ 2:1 es adecuado. La reacción generalmente se deja durante 1 hora a 30 °C.

Tercer aspecto de la invención

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de reducción de la contaminación de un intermediario polisacárido-enlazador obtenible durante el procedimiento del primer aspecto de la invención con enlazador no reaccionado, que comprende una etapa de precipitación del enlazador no reaccionado bajo condiciones acuosas a un pH menor de 5. Este procedimiento no requiere el uso de disolventes tóxicos tales como dioxano o acetato de etilo. En particular, el procedimiento permite que la descontaminación tenga lugar bajo condiciones acuosas mientras que se evita la desactivación del intermediario polisacárido-enlazador (por ejemplo, mediante hidrólisis).

Este procedimiento es particularmente adecuado cuando el enlazador es SIDEA. El polisacárido puede ser en particular el O-antígeno-núcleo de un lipopolisacárido, particularmente de *S. Paratyphi A*, *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*.

Generalmente, el pH al que la precipitación tiene lugar está entre 2 y 5. En las realizaciones de la invención el pH puede estar entre 2-3, 3-4 o 4-5. Se puede usar cualquier solución acuosa adecuada para obtener este pH. Por ejemplo, los inventores han encontrado que es adecuada la adición de una solución tampón acuosa, por ejemplo, tampón de citrato acuoso. El tampón de citrato puede ser, por ejemplo, citrato de sodio 100 mM a pH 3. El volumen de solución acuosa añadida se selecciona para asegurar que el enlazador no reaccionado sea insoluble en la mezcla final. Por ejemplo, los inventores han encontrado que es adecuado un contenido de agua (v/v) de >60 % (por ejemplo, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 % etc.), particularmente para el enlazador SIDEA. Estas condiciones se pueden obtener, por ejemplo, triplicando el volumen total de la mezcla de reacción con solución de citrato de sodio 100 mM a pH 3. La mezcla generalmente se deja durante aproximadamente 30 minutos. El precipitado se separa, por ejemplo, mediante centrifugación.

Los inventores también han encontrado que una solución acuosa de ácido clorhídrico (HCl) es adecuada para

reducir el pH. Por ejemplo, se añaden 2x volumen de HCl 82,5 ppm a la mezcla de reacción a una concentración de HCl de 55 ppm en la mezcla final, dando como resultado un pH de 2,3. La solución se mezcla a 4 °C durante 30 min y la solución se recupera mediante centrifugación.

5 El intermediario polisacárido-enlazador se puede recuperar de la solución mediante precipitación con alcohol. De este modo, se reduce la contaminación del intermediario polisacárido-enlazador con enlazador no reaccionado, por ejemplo, a menos del 10 % del número de moles de enlazador no reaccionado en relación con el número de moles de enlazador en el intermediario.

10 El alcohol puede ser en particular etanol, aunque se pueden usar otros alcoholes inferiores (por ejemplo, metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc.). El etanol generalmente se añade a la solución que contiene el intermediario polisacárido-enlazador para dar una concentración de etanol final (v/v) de entre 80 % y 95 %. La concentración de etanol final óptima puede depender del intermediario polisacárido-enlazador. Cuando el polisacárido es el O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi A*, los inventores han encontrado que una concentración de aproximadamente 85 % es adecuada.

15 El etanol se puede añadir a la solución que contiene el intermediario polisacárido-enlazador en forma pura o se puede añadir en forma diluida con un disolvente miscible (por ejemplo, agua). El intermediario polisacárido-enlazador precipitado se recupera, por ejemplo, mediante centrifugación. Se puede lavar antes del uso adicional.

En una realización el intermediario con el enlazador SIDEA se precipita usando 2-propanol (90 % de concentración final v/v) y el precipitado OAg-SIDEA se lava con etanol absoluto.

20 Preferentemente, a continuación, el intermediario polisacárido-enlazador recuperado se usa en la etapa (b) del primer aspecto de la invención, anteriormente descrito. El procedimiento de este tercer aspecto de la invención en particular puede tener lugar entre las etapas (a) y (b) del procedimiento del primer aspecto de la invención.

El polisacárido

25 La invención implica un polisacárido. Generalmente, el polisacárido tiene un terminal reductor que es una subunidad de KDO. La subunidad de KDO comprende un grupo carbonilo. En el primer aspecto de la invención, el grupo carbonilo se usa para acoplar el polisacárido al enlazador en la etapa (a) del procedimiento. En el segundo aspecto de la invención, el grupo carbonilo toma parte en la aminación reductiva del procedimiento. En ambos aspectos, aunque es típico para el polisacárido tener un terminal reductor que es una subunidad de KDO, el experto apreciará que se pueden usar otros polisacáridos que comprenden un grupo carbonilo en sus terminales reductores. Por ejemplo, los inventores han encontrado que se puede usar el polisacárido capsular del *N. meningitidis* serogrupo X.

30 Otros polisacáridos capsulares bacterianos que pueden ser adecuados para su uso en la invención se describen más adelante.

35 El polisacárido comprende el dominio núcleo y un O-antígeno del lipopolisacárido de una bacteria Gram-negativa unido al dominio núcleo. El dominio núcleo es un componente del lipopolisacárido encontrado en la membrana exterior de la bacteria Gram-negativa. El lipopolisacárido también comprende un O-antígeno, el cual está unido por el dominio núcleo a un dominio de lípido A. El dominio núcleo tiene una subunidad de KDO terminal, la cual está unida al dominio del lípido A en el lipopolisacárido nativo. Esta subunidad de KDO puede ser la subunidad de KDO anteriormente descrita que puede estar en el terminal reductor de un polisacárido usado en la invención. El polisacárido usado en la invención comprende un dominio núcleo de un lipopolisacárido de una bacteria Gram-negativa y un O-antígeno unido al dominio núcleo (referido en el presente documento como un O-antígeno-núcleo).

40 El O-antígeno-núcleo es en particular el O-antígeno y el dominio núcleo de un lipopolisacárido específico (es decir, el lipopolisacárido sin su dominio de lípido A). Un procedimiento típico para la purificación de estos O-antígeno-núcleos se basa en el procedimiento fenol-agua de Westphal and Jann, descrito primero en la década de 1960 [ref. 17], seguido por destoxificación del lipopolisacárido con ácido acético o hidrazina anhidra. Por ejemplo, este procedimiento se aplica a *S. Typhimurium* en la ref. 1; *S. Paratyphi A* en la ref. 2; *S. dysentery* en la ref. 13 y *E. coli*

45 0157 en la ref. 10. Estos procedimientos implican sedimentación de las bacterias; inactivación del cultivo mediante fijación de formalina; extracción de fenol en caliente del lipopolisacárido; y tratamiento del lipopolisacárido extraído con ácido acético (para separar el lípido A) o hidrazina anhidra (para someter a des-O-acilación el lípido A) antes de la purificación. Estos procedimientos también pueden implicar el tratamiento de la masa celular alterada o el lipopolisacárido extraído con ADNasa, ARNasa y la proteinasa para reducir impurezas.

50 Para la realización de la aminación reductiva en el grupo carbonilo KDO descrito en el presente documento, el lípido A se debería separar dejando el grupo KDO libre para hacer reaccionar. Con este fin la extracción y la purificación del polisacárido se puede realizar preferentemente mediante hidrólisis de ácido acético tal como se describe en, por ejemplo, las referencias 1-2-10-13 y 18. Sin embargo, la invención se puede aplicar a cualquier O-antígeno-núcleo adecuado, incluyendo O-antígeno-núcleo obtenido mediante diferentes procedimientos de purificación.

55 Generalmente, el O-antígeno y el dominio núcleo es del lipopolisacárido de una bacteria de *Salmonella*, por ejemplo, de los serogrupos A, B o D de *Salmonella*, y particularmente de *Salmonella Paratyphi A*. Los O-antígenos de los serogrupos de *Salmonella A*, B y D han sido descritos y se piensa que comparten una cadena principal común: $\rightarrow 2\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 4\text{)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3\text{)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$. La especificidad del serogrupo de *Salmonella Paratyphi A* está

conferido por una α -3,6-didesoxiglucosa (α -D-paratosa) unida (1 \rightarrow 3) a la manosa de la cadena principal. La α -L-ramnosa de la cadena principal está parcialmente O-acetilada en C-3 (ref. 2, Figura 1a). También se ha informado que la α -D-paratosa tiene diversos grados de O-acetilación. El O-antígeno de *S. Paratyphi A* a veces es referido como O:2. La estructura publicada del O-antígeno y el dominio núcleo de *S. Paratyphi A* se muestra en la Figura 2, incluyendo la subunidad de KDO y el grupo amino primario (dentro de un grupo de pirofosfoetanolamina) en el dominio núcleo. El O-antígeno en la invención también puede ser de *S. Typhimurium*. La estructura publicada de la unidad de repetición de este O-antígeno (a veces referido como O:4,5) se muestra en la Figura 1b. El O-antígeno también puede ser de *S. Enteritidis* (O:9, estructura publicada de la unidad de repetición mostrada en la Figura 1c). Los O-antígenos naturalmente derivados pueden contener variaciones estructurales en comparación con las estructuras publicadas para estos O-antígenos.

El O-antígeno y el dominio núcleo también pueden ser de especies de *Shigella*, por ejemplo, de *S. flexneri*. Otras especies de *Shigella* que pueden proporcionar el O-antígeno y el dominio núcleo usados en la invención son *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii* [ref. 19]. El O-antígeno y el dominio núcleo también pueden ser de *E. coli*, por ejemplo, *E. coli* 0157. Otras bacterias Gram-negativas que contienen lipopolisacárido que pueden proporcionar el dominio O-antígeno y el dominio núcleo usados en la invención son *Klebsiella pneumoniae* [ref. 20], *Vibrio cholerae* [ref. 21], *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* [ref. 22].

El polisacárido se puede modificar químicamente en relación con el polisacárido encontrado en la naturaleza. Por ejemplo, el polisacárido puede estar des-O-acetilado (parcial o completamente), pero es preferido para polisacáridos que comprenden O-antígeno no estar des-O-acetilado. Si tiene lugar, entonces, se puede dar la desacetilación antes, durante o después de otras etapas de procesamiento, pero generalmente se da antes de cualquier etapa de acoplamiento. El efecto de desacetilación, etc., se puede evaluar mediante ensayos rutinarios. Por ejemplo, la relevancia de la O-acetilación sobre el O-antígeno de *S. Paratyphi A* se discute en la referencia 2. En el presente documento se dice que el O-antígeno nativo de *S. Paratyphi A* tiene aproximadamente 80 % de O-acetilación. El O-antígeno des-O-acetilado conjugado no suscitó anticuerpos antilipopolisacáridos con actividad bactericida. En consecuencia, el O-antígeno de *S. Paratyphi A* usado en la presente invención puede tener entre 0 y 100 % de O-acetilación, pero es preferido para el O-antígeno estar O-acetilado. El nivel de O-acetilación puede depender de la cepa bacteriana que proporcionó el O-antígeno. Por ejemplo, el grado de O-acetilación del O-antígeno de *S. Paratyphi A* puede ser del 10-100 %, 20-100 %, 30-100 %, 40-100 %, 50-100 %, 55-95 %, 55-85 %, 60-80 % o 65-75 %. Generalmente, el grado de O-acetilación del O-antígeno de *S. Paratyphi A* es de 55-85 %, particularmente 65-75 %. Sin embargo, mayores grados de O-acetilación, por ejemplo, 70-100 %, particularmente 85-95 % son también típicos en algunas cepas.

El grado de O-acetilación del polisacárido se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante RMN de protón (por ejemplo, tal como se describe en la referencia 23), RMN de carbono (por ejemplo, tal como se describe en la referencia 2), el procedimiento de Hestrin [24] o HPAEC-CD [25]. Los grupos de O-acetilo se pueden separar mediante hidrólisis, por ejemplo, mediante tratamiento con una base tal como hidrazina anhídrida [2]. Para mantener altos niveles de O-acetilación sobre el polisacárido, se minimizan los tratamientos que conducen a hidrólisis de los grupos O-acetilo, por ejemplo, los tratamientos a extremos de pH.

Los polisacáridos pueden ser útiles en la forma de oligosacáridos. Estos se forman de forma conveniente mediante fragmentación de polisacárido purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), que normalmente le seguirá purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

Los polisacáridos se pueden purificar mediante técnicas conocidas. Sin embargo, la invención no se limita a polisacáridos purificados de fuentes naturales, y los polisacáridos se pueden obtener mediante otros procedimientos, tales como síntesis total o parcial.

La molécula portadora

La invención implica el uso de moléculas portadoras, las cuales son generalmente proteínas. En general, la conjugación covalente de sacáridos con portadores aumenta la inmunogenicidad de sacáridos ya que los convierte de antígenos T-independientes a antígenos T-dependientes, permitiendo así la imprimación para memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas [por ejemplo, ref. 26] y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisado en las ref. 27 a 35].

Las proteínas portadoras preferidas son toxinas bacterianas, tales como toxinas de la difteria o del tétanos, o toxoides o mutantes de los mismos. Estas frecuentemente se usan en vacunas conjugadas. La toxina de la difteria mutante CRM₁₉₇ es particularmente preferida [36].

Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen el complejo proteico de la membrana exterior de *Neisseria meningitidis* [37], péptidos sintéticos [38,39], proteínas de choque térmico [40,41], proteínas de tos ferina citoquinas [44], linfoquinas [44], hormonas [44], factores de crecimiento [44], proteínas artificiales que comprenden epítopos de linfocito T de CD4⁺ humanos múltiples de varios antígenos derivados de patógeno [45] tales como N19 [46], proteína D de *Haemophilus influenzae* [47-49], pneumolisina [50] o sus derivados no tóxicos [51], proteína de superficie pneumocócica PspA [52], proteínas de absorción de hierro [53], toxina A o B de *Clostridium difficile* [54], exoproteína

A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (rEPA) [55], etc.

Es posible usar mezclas de proteínas portadoras. Una proteína portadora única puede llevar múltiples polisacáridos diferentes [56].

Combinaciones de conjugados y otros antígenos

- 5 Además de proporcionar conjugados individuales tal como se han descrito anteriormente, la invención proporciona una composición que comprende un conjugado de la invención y uno o más antígenos adicionales. La composición es generalmente una composición inmunogénica.

10 El antígeno adicional es preferentemente polisacárido capsular de *Salmonella* Typhi (Vi) o *Citrobacter* Vi. Este sacárido capsular se puede conjugar, por ejemplo, con exoproteína A de *P. aeruginosa* mutante recombinante (como en la ref. 57) o más preferentemente con CRM₁₉₇ [36, 58, 59]. Un conjugado Vi-CRM₁₉₇ preferido para su uso en la presente invención se describe en la referencia 60.

15 El(los) antígeno(s) adicional(es) puede(n) comprender conjugados adicionales, o bien preparados mediante un procedimiento de la invención o mediante un procedimiento diferente. Por ejemplo, en una realización la presente invención proporciona una composición que comprende un conjugado de O-antígeno-núcleo de *S. Typhimurium* y un conjugado de O-antígeno-núcleo de *S. Enteritidis*, en el que al menos uno (más generalmente ambos) de los conjugados se prepara mediante un procedimiento de la invención. En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un conjugado de O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi* A, un conjugado de O-antígeno-núcleo de *S. Typhimurium* y un conjugado de O-antígeno-núcleo de *S. Enteritidis*, en el que al menos uno de los conjugados (por ejemplo, dos o más, generalmente todos los tres) se prepara mediante un procedimiento de la invención.

En otras realizaciones, el uno o más antígeno adicional se selecciona de lo siguiente

- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, ref. 61-63; capítulos 22 y 23 de la ref. 64].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como un virus inactivado [por ejemplo, 65, 66; capítulo 15 de la ref. 64].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo, 66, 67; capítulo 16 de la ref. 64].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, 68].
- un antígeno de la *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de la tos ferina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, ref. 69 y 70; capítulo 21 de la ref. 64].
- un antígeno de difteria, tal como un toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 13 de la ref. 64].
- un antígeno del tétanos, tal como el toxoide del tétanos [por ejemplo, capítulo 27 de la ref. 64].
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, capítulo 14 de la ref. 64].
- un antígeno de *N. gonorrhoeae*.
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 78].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 79].
- antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 80, 81; capítulo 24 de la ref. 64] tal como IPV.
- antígeno(s) de la rabia [por ejemplo, 82] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 83, RabAvert™].
- antígenos del sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo, capítulos 19, 20 y 26 de la ref. 64].
- antígeno(s) de la gripe [por ejemplo, capítulos 17 y 18 de la ref. 64], tal como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 84].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) [por ejemplo, 85, 86, 87].
- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) [por ejemplo, 88-90].
- un antígeno de *S. epidermidis* [por ejemplo, polisacárido capsular tipo I, II y/o III obtenible de las cepas ATCC-31432, SE-360 y SE-10 tal como se describe en las ref. 91, 92 y 93].

Cuando se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato, generalmente se conjuga con un portador para aumentar la inmunogenicidad. La conjugación de antígenos de sacárido de *H. influenzae* B y pneumocócicos es bien conocida.

50 Los antígenos de proteína tóxicos se pueden destoxificar cuando sea necesario (por ejemplo, destoxicación de la toxina de tos ferina mediante medios químicos y/o genéticos [70]).

Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición también se prefiere incluir antígeno del tétanos y antígenos de tos ferina. De forma similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos también es preferido incluir antígenos de difteria y tos ferina. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de tos ferina también se prefiere incluir antígenos de difteria y tétanos. Estas combinaciones además pueden comprender un antígeno del virus de la hepatitis B y/o un antígeno de sacárido de *H. influenzae* B, generalmente ambos.

Los antígenos en la composición generalmente estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para suscitar una respuesta inmune

frente a ese antígeno.

Como alternativa al uso de proteínas antígenos en la composición de la invención, se puede usar el ácido nucleico que codifica el antígeno [por ejemplo, ref. 94 a 102]. Por tanto, los componentes proteicos de las composiciones de la invención se pueden reemplazar mediante ácido nucleico (normalmente ADN, por ejemplo, en la forma de un plásmido) que codifica la proteína.

Composiciones farmacéuticas y procedimientos

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un conjugado de la invención y (b) un portador farmacéuticamente aceptable. "Portadores farmacéuticamente aceptables" típicos incluyen cualquier portador que no auto induce la producción de anticuerpos dañinos al individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son generalmente grandes macromoléculas lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa [103], trehalosa [104], lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos portadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Además, las sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampón de pH, y similares, pueden estar presentes. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato libre de pirógeno estéril es un portador típico. Una discusión rigurosa de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 105.

Las composiciones de la invención pueden estar en forma acuosa (es decir, soluciones o suspensiones) o en forma seca (por ejemplo, liofilizado). Si se usa una vacuna seca, a continuación, se reconstituirá dentro de un medio líquido antes de la inyección. La liofilización de vacunas conjugadas es conocida en la técnica, por ejemplo, el producto Menjugate™ se presenta en forma liofilizada, mientras que NeisVac-C™ y Meningitec™ se presentan en forma acuosa. Para estabilizar los conjugados durante la liofilización, puede ser típico incluir un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo, a entre 1 mg/ml y 30 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 25 mg/ml) en la composición.

Las composiciones pueden estar presentes en viales, o se pueden presentar en jeringas rellenas preparadas. Las jeringas pueden ser suministradas con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o dosis múltiples.

Las composiciones acuosas de la invención son también adecuadas para reconstituir otras vacunas de una forma liofilizada. Cuando una composición de la invención es para usarse para dicha reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, el cual puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa rellena preparada y un vial, con los contenidos de la jeringa a usar para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

Las composiciones de la invención se pueden empaquetar en forma de dosis única o en forma de dosis múltiple. Para la forma de dosis múltiple, los viales son preferidos a las jeringas prerellenas. Los volúmenes de dosis eficaces se pueden establecer de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de 0,5 ml, por ejemplo, para inyección intramuscular.

El pH de la composición generalmente está entre 6 y 8, por ejemplo, aproximadamente 7. El pH adecuado se puede mantener mediante el uso de un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, es típico usar un tampón de histidina [106]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógeno. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y son más preferentemente composiciones de vacuna. Las vacunas según la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero generalmente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), así como algún otro componente, como sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, o 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 condición de salud y física del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (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 valoración del doctor tratante de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caerá en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de pruebas rutinarias.

Dentro de cada dosis, la cantidad de un antígeno de sacárido individual generalmente será de entre 1 a 50 µg (medido como masa de sacárido), por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg.

Las composiciones de la invención se puede preparar en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, o bien como soluciones líquidas o suspensiones. La composición se puede preparar para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizador. La

composición se puede preparar como un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como pulverizado, gotas, gel o polvo [por ejemplo, ref. 107 y 108]. Se ha informado del éxito con la administración nasal de sacáridos pneumocócicos [109, 110], sacáridos de Hib [111], sacáridos de MenC [112], y mezclas de conjugados de sacárido de Hib y MenC [113].

- 5 Las composiciones de la invención pueden incluir una antimicrobiana, particularmente cuando se empaqueta en formato de dosis múltiple.

Las composiciones de la invención pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes a niveles bajos, por ejemplo, <0,01 %.

- 10 Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de 10+2 mg/ml de NaCl es típica.

Las composiciones de la invención generalmente incluirán un tampón. Un tampón fosfato es típico.

Las composiciones de la invención generalmente se administrarán junto con otros agentes inmunoreguladores. En particular, las composiciones normalmente incluirán uno o más adyuvantes. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a:

15 A. Composiciones que contienen mineral

- 20 Las composiciones que contienen mineral adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véase los capítulos 8 y 9 de la ref. 117], o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferida la adsorción. Las composiciones que contienen mineral también se pueden formular como una partícula de sal de metal.

- 25 Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" generalmente son sales de oxihidróxido de aluminio, las cuales son normalmente al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, el cual puede estar representado por la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, se pueden distinguir de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, por espectroscopía de infrarrojo (IR), en particular, por la presencia de una banda de adsorción a 1.070 cm^{-1} y un "hombro" fuerte a $3.090\text{-}3.100 \text{ cm}^{-1}$ [capítulo 9 de la ref. 117]. El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio está reflejado por la anchura de la banda de difracción a peso medio (WHH), con partículas escasamente cristalinas que muestran mayor amplitud de línea debido a los menores tamaños de cristalito. El área superficial incrementa cuando WHH incrementa, y se ha visto que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad para la adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, tal como se ve en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica para adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio generalmente es de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga de superficie positiva a pH fisiológico. Se ha informado de las capacidades adsorbentes de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

- 35 Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" generalmente son hidroxifosfatos de aluminio, con frecuencia conteniendo también una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Se pueden obtener mediante precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen el grado de sustitución del fosfato para hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de AlPO_4 estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro de IR a 3.164 cm^{-1} (por ejemplo, a $200 \text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la ref. 117).

- 45 La relación molar $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio generalmente estará entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente 0,95+0,1. El fosfato de aluminio generalmente será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio generalmente será particulado (por ejemplo, morfología tipo placa tal como se ve en las micrográficas electrónicas de transmisión). 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 ha informado de las capacidades adsorbentes de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

- 50 El punto de carga cero (PZC) de fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato para hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de reactivos usados para preparar la sal mediante precipitación. La PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados según la invención generalmente tendrán 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 fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero esto no es siempre necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y libres de pirógeno. 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 aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

- 5 En una realización, un componente adyuvante incluye una mezcla de tanto un hidróxido de aluminio como un fosfato de aluminio. En este caso puede ser más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1, por ejemplo, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

- La concentración de Al^{+++} en una composición para 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 10 mg/ml. Se prefiere un máximo de $< 0,85$ mg/dosis.

B. Emulsiones de aceite

- Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [Capítulo 10 de la ref. 117; véase también la ref. 114] (5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80, y 0,5 % de Span 85, formulado en partículas submicra usando un microfluidizador).
15 También se puede usar adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante de Freund incompleto (IFA).

- Se conocen diversas emulsiones de aceite en agua adecuadas, y generalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el(los) aceite(s) y el(los) tensioactivo(s) biodegradable(s) (metabolizable(s)) y biocompatible(s). Las gotitas de aceite en la emulsión generalmente son menores de 5 μm de diámetro, y ventajosamente la emulsión comprende gotitas de aceite con un diámetro submicra, siendo estos tamaños
20 pequeños alcanzados con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotitas con un tamaño menor de 220 nm son preferidas ya que pueden ser sometidas a esterilización por filtro.

- La invención se puede usar con aceites tales como aquellos de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Las fuentes para los aceites vegetales incluyen nueces, semillas y grano. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ilustran los aceites de nueces. El aceite de jojoba se
25 puede usar, por ejemplo, obtenido de la semilla de la jojoba. Los aceites de semilla incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de grano, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros granos de cereal tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Los ésteres de ácido graso de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se dan de manera natural en aceites de semilla, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados que parten de los aceites de nueces y
30 semilla. Las grasas y los aceites de la leche de mamífero se metabolizan y, por lo tanto, se pueden usar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los pescados contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como de esperma de ballena ilustran varios de los aceites de pescado que se pueden usar en el presente documento. Un número de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de 5-carbono isopreno y generalmente son referidos como 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-tetracosahexaeno. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase
40 más adelante). Las emulsiones de aceite en agua que comprenden escualeno son particularmente preferidas. Se pueden usar las mezclas de aceites.

- Los tensioactivos se pueden clasificar por su "HLB" (balance hidrófilo/lipófilo). 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 se puede usar con tensioactivos que incluyen, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitano (comúnmente referidos como los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), vendido bajo el nombre comercial DOWFAX™, tal como copolímeros bloque EO/PO lineales; octoxinóles, los cuales pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiol) de repetición, siendo el octoxinol-9 (Tritón X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes láuricos, cetílicos, estearílicos y oleicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitano (comúnmente conocidos como los SPAN), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Tritón X-100. Tal como se ha mencionado anteriormente, detergentes tales
55 como Tween 80 pueden contribuir a la estabilidad térmica véase en los ejemplos de más adelante.

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de polioxietileno sorbitano tal como monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Tritón X-100) es también adecuado. Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitano y/o un octoxinol.

Cantidades preferidas de los tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitano (tales como Tween 80) 0,01 a 1 %, en particular aproximadamente 0,1 %; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Tritón X-100, u otros detergentes en la serie Tritón) 0,001 a 0,1 %, en particular 0,005 a 0,02 %; polioxietileno éteres (tales como laureth 9) 0,1 a 20 %, preferentemente 0,1 a 10 % y en particular 0,1 a 1 % o aproximadamente 0,5 %.

5 Adyuvantes de emulsión aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero sin limitación:

- Una emulsión submicra de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión por volumen puede ser de aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas relaciones llegan a ser de 4,3 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,48 % de Span 85. Este adyuvante es conocido como "MF59" [114-116], tal como se describe a más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 117 y el capítulo 12 de la ref. 118. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.
- Una emulsión que comprende escualeno, un α -tocoferol, y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de tocoferol y de 0,3 a 3 % de Tween 80, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 (por ejemplo, 0,90) ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el Tween 80 pueden estar presentes en relación en volumen de aproximadamente 5:2, o en una relación en peso de aproximadamente 11:5. Una dicha emulsión se puede preparar disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución al 2 %, a continuación, mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), a continuación, microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicra, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente de Tritón (por ejemplo, Tritón X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente de Tritón (por ejemplo, Tritón X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Tritón X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para muramil dipéptidos, y se han usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [119] (0,05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualeno, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). También se puede usar sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [120] (5 % de escualeno, 1,25 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere microfluidización.
- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de polioxietileno alquil éter (por ejemplo, polioxietileno (12) cetostearyl éter) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitano o éster de manida, tal como monoleato de sorbitano o "Span 80"). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos 90 % de las gotitas de aceite (por volumen) con un tamaño menor de 200 nm [121]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como docecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. Dichas emulsiones se pueden liofilizar.
- Una emulsión que tiene de 0,5-50 % de un aceite, 0,1-10 % de un fosfolípido, y 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Tal como se describe en la referencia 122, los componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomiélinea y cardiolipina. Los tamaños de gotita submicra son ventajosos.
- Una emulsión de aceite en agua submicra de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tales como QuilA saponina, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 123, producido mediante adición de amina alifática a desacilsaponina por el grupo carboxilo del ácido glucorónico), bromuro de dimetildiodecilaamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.
- 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 copolímero bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [124].
- 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 copolímero bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [124].
- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, un colesterol) están asociados como micelios helicoidales [125].

60 Los antígenos y los adyuvantes en una composición generalmente estarán en mezcla en el momento de la administración a un paciente. Las emulsiones se pueden mezclar con antígeno durante la fabricación, o extemporáneamente, en el momento de la administración. Por lo tanto, el adyuvante y el antígeno se pueden

mantener por separado en una vacuna empaquetada o distribuida, preparada para la formulación final en el momento del uso. El antígeno generalmente estará en una forma acuosa, de modo que la vacuna finalmente se prepara mezclando dos líquidos. La relación en volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero generalmente es de aproximadamente 1:1.

5 C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 117]

Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterogéneo de glucósidos esteroides y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de un amplio rango de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol de *Quillaia saponaria* Molina ha sido muy estudiada como adyuvantes. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officinalis* (hierba jabonera). Las formulaciones de adyuvante 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. Se han identificado las fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 está desvelado en la ref. 126. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide tal como el colesterol [127].

Las combinaciones de saponinas y esteroides se pueden usar para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM; véase el capítulo 23 de la ref. 117; también las ref 128 y 129). Los ISCOM generalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida se puede usar en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [130].

Una revisión del desarrollo de saponina basado en adyuvantes se puede encontrar en las ref. 131 y 132.

D. Derivados bacterianos o microbianos

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

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 y 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se desvela en la ref. 133. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo bastante pequeñas para ser filtradas en estéril a través de una membrana de 0,22 µm [133]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen análogos a monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 [134,135].

Derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las ref. 136 y 137.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contienen una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). También se han mostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones de nucleótidos/análogos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 138, 139 y 140 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, reemplazo de guanosina con 2'-deoxi-7-deazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se discute más en las ref. 141-146.

La secuencia de CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [147]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocito B, tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se discuten en las ref. 148-150. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG se pueden unir a sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, las ref. 151-153.

Un adyuvante particularmente útil basado alrededor de oligonucleótidos inmunoestimulantes es conocido como IC-31™ [154-156]. Por tanto, un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) incluyendo al menos un (y preferentemente múltiples) motivo Cpl (es decir, una citosina unida a una inosina para formar un dinucleótido), y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) incluyendo al menos un (y preferentemente múltiples)

secuencia(s) de tripéptido Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende secuencia 26-mero 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO: 1). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 11-mero KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 2). Esta combinación de SEQ ID NO: 1 y 2 proporciona el adyuvante IC-31™.

- 5 Las toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y los derivados destoxificados de las mismas se pueden usar como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT"), o tos ferina ("PT"). El uso de toxinas ADP-ribosilantes destoxificadas como adyuvantes mucosos se describe en la ref. 157 y como adyuvantes parenterales en la ref. 158. La toxina o toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende ambas subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es una LT mutante destoxificada tal como LT-K63, LT-R72, y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se puede encontrar en las ref. 159-166. Una CT mutante útil es o CT-E29H [167]. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en las alineaciones de las subunidades A y B de toxinas ADP-ribosilantes expuestas en la ref. 168, específicamente incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

E. Inmunomoduladores humanos

- Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [169], etc.) [170], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de colonia de macrófago, y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferido es IL-12.

F. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

- Los bioadhesivos y los mucoadhesivos también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [171] o mucoadhesivos tales como derivados de entrecruzamiento de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El Chitosán y sus derivados también se pueden usar como adyuvantes en la invención [172].

G. Micropartículas

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

H. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 117)

Ejemplos de formulaciones de liposoma adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en las ref. 173-175.

I. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para usar adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos más en las ref. 176 y 177.

- 40 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes anteriormente identificados. Por ejemplo, en la invención se pueden usar las siguientes composiciones de adyuvante : (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [178]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [179]; (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) [180]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [181]; (6) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de Tween 80™, 5 % de polímero bloque pluronic L121, y thr-MDP, o bien microfluidizado en una emulsión submicra o sometido a vórtex para generar una emulsión de gran tamaño de partícula. (7) Sistema adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 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 pared celular (CWS), 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).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 117.

Un adyuvante de hidróxido de aluminio es útil, y los antígenos generalmente se adsorben a esta sal. También se prefieren las emulsiones de aceite en agua que comprenden escualeno, con gotitas de aceite submicra,

particularmente en los ancianos. Las combinaciones adyuvantes útiles incluyen combinaciones de los adyuvantes Th1 y Th2 tales como CpG y una sal de aluminio, o resiquimod y una sal de aluminio. Se pueden usar una combinación de una sal de aluminio y 3dMPL.

Procedimientos de tratamiento

- 5 Se desvela un procedimiento de provocación de una respuesta inmune en un mamífero, comprendiendo la administración de una composición farmacéutica de la invención al mamífero. La respuesta inmune es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos. El procedimiento puede provocar una respuesta de refuerzo.

10 El mamífero es preferentemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un bebé o infante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna dirigida a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosis, inmunogenicidad, etc. El mamífero también puede ser un animal de granja, por ejemplo, un cerdo o una vaca. Específicamente se prevén dichos usos veterinarios. El ave es preferentemente de granja, particularmente, un pavo u otras aves domésticas.

- 15 La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como medicamento. El medicamento es preferentemente capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferentemente una vacuna.

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

- 20 Estos usos y procedimientos son preferentemente para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por una bacteria a partir de la cual se deriva el polisacárido.

25 Una manera de probar la eficacia del tratamiento terapéutico implica hacer un seguimiento de la infección bacteriana después de la administración de la composición de la invención. Una manera de probar la eficacia del tratamiento profiláctico implica hacer un seguimiento de las respuestas inmunes frente a los antígenos bacterianos después de la administración de la composición, por ejemplo, usando un ensayo de anticuerpo bactericida del suero.

- 30 Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpo en un paciente que es superior al criterio para seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpo asociado por encima del cual se considera que un hospedador se seroconvierte frente al antígeno son bien conocidos, y dichos títulos están publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de sujetos es seroconvertido, más preferentemente más del 90 %, aún más preferentemente más del 93 % y los más preferentemente 96-100 %.

35 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir por inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o al brazo. La inyección puede ser por una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero se puede usar alternativamente la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

Las composiciones de la invención se pueden usar para suscitar inmunidad sistémica y/o mucosa.

- 40 El tratamiento por dosis puede ser una pauta de dosis única o una pauta de dosis múltiple. Las dosis múltiples se pueden usar en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. Una pauta de dosis primaria puede estar seguida por una pauta de dosis de refuerzo. El momento adecuado entre las dosis de imprimación (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la imprimación y refuerzo, se pueden determinar de forma rutinaria.

45 General

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, las referencias 182-189, etc.

- 50 Cuando la invención se refiere a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de linfocito B y/o un epítipo de linfocito T. Dichos epítipos se pueden identificar empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [190,191] o procedimientos similares), o se pueden prever (por ejemplo, usando el índice antigénico de Jameson-Wolf [192], planteamientos basados en matriz [193], MAPITOPE [194], TEPITOPE [195,196], redes neuronales [197], OptiMer & EpiMer [198, 199], ADEPT [200], Tsites [201], hidrofiliidad [202], índice antigénico [203] o los procedimientos desvelados en las referencias 204-208, etc.). Los epítipos son las partes de un antígeno que se reconocen por y se

unen a los sitios de unión a antígeno de anticuerpos o receptores de linfocito T, y también se pueden referir como “determinantes antigénicos”.

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

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

La palabra “básicamente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que estar “básicamente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra “básicamente” se puede omitir de la definición de la invención.

- 10 Se apreciará que los anillos de azúcar pueden existir en forma abierta y cerrada y que ambas formas están abarcadas por la invención. De forma similar, se apreciará que los azúcares pueden existir en formas de piranosa y furanosa y que también se abarcan ambas formas. También se abarcan diferentes formas anoméricas de azúcares. KDO en particular puede someterse a reorganizaciones, particularmente bajo condiciones ácidas. Estas formas derivadas de KDO también están abarcadas por la invención. Por ejemplo, cuando la invención implica una subunidad de KDO (por ejemplo, en la aminación reductiva de los aspectos primero y segundo), la subunidad puede estar en una o más de estas formas derivadas.

- Un grupo amino primario puede estar representado por la fórmula NH_2R . El grupo R generalmente será donante de electrones, e incluye $-\text{NH}$, $-\text{O}$, hidrocarbilo C_{1-8} , particularmente alquilo C_{1-8} , especialmente metilo. R es con frecuencia $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$ o $-\text{C}_3\text{H}_7$. El hidrocarbilo se puede sustituir con uno o más grupos, tales como: halógeno (por ejemplo, Cl, Br, F, I), trihalometilo, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{N}^+(\text{alquiloC}_{1-6})_2\text{O}^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SOalquiloC}_{1-6}$, $-\text{SO}_2\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{SO}_3\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OalquiloC}_{1-6}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, alquilo C_{1-6} , $-\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{alquiloC}_{1-6})$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{S})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{SO}_2\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{CO}_2\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{SO}_2\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{NH-alquiloC}_{1-6}$, $-\text{S-alquiloC}_{1-6}$ o $-\text{O-alquiloC}_{1-6}$. El término “hidrocarbilo” incluye grupos monovalentes lineales, ramificados o cíclicos que consisten en carbono e hidrógeno. Por tanto los grupos hidrocarbilo incluyen, grupos alquilo, alqueno y alquino, grupos cicloalquilo (incluyendo policicloalquilo), cicloalqueno y arilo y combinaciones de los mismos, por ejemplo, grupos alquilcicloalquilo, alquilpolicicloalquilo, alquilarilo, alquenoarilo, cicloalquilarilo, cicloalquenoarilo, cicloalquilalquilo, policicloalquilalquilo, arilalquilo, arilalqueno, arilcicloalquilo y arilcicloalqueno. El hidrocarbilo típico es hidrocarbilo C_{1-14} , más particularmente hidrocarbilo C_{1-8} . En el enlazador adicional usado en la invención, el grupo amino primario generalmente es parte de un grupo hidrazida (especialmente $-\text{C}(=\text{O})\text{NHNH}_2$).

- Un grupo éster puede estar representado por la fórmula $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$. El grupo R generalmente será donante de electrones, e incluye hidrocarbilo C_{1-8} , particularmente alquilo C_{1-8} , especialmente metilo. R es con frecuencia $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$ o $-\text{C}_3\text{H}_7$. El hidrocarbilo puede estar sustituido con uno o más grupos, tales como: halógeno (por ejemplo, Cl, Br, F, I), trihalometilo, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{N}^+(\text{alquilC}_{1-6})_2\text{O}^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SOalquiloC}_{1-6}$, $-\text{SO}_2\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{SO}_3\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OalquiloC}_{1-6}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, alquilo C_{1-6} , $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{alquilo})_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{alquiloC}_{1-6})$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{S})\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{SO}_2\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{CO}_2\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{SO}_2\text{alquiloC}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquilC}_{1-6})\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{alquiloC}_{1-6})_2$, $-\text{NH-alquiloC}_{1-6}$, $-\text{S-alquiloC}_{1-6}$ o $-\text{O-alquiloC}_{1-6}$. El término “hidrocarbilo” incluye grupos monovalentes lineales, ramificados o cíclicos que consisten en carbono e hidrógeno. Por tanto, los grupos “hidrocarbilo” incluyen grupos alquilo, alqueno y alquino, grupos cicloalquilo (incluyendo policicloalquilo), cicloalqueno y arilo y combinaciones de los mismos, por ejemplo, grupos alquilcicloalquilo, alquilpolicicloalquilo, alquilarilo, alquenoarilo, cicloalquilarilo, cicloalquenoarilo, cicloalquilalquilo, policicloalquilalquilo, arilalquilo, arilalqueno, arilcicloalquilo y arilcicloalqueno. El hidrocarbilo típico es hidrocarbilo C_{1-14} , más particularmente hidrocarbilo C_{1-8} . En el enlazador usado en la invención, el grupo éster es generalmente un grupo éster N-hidroxisuccinimida.

Breve descripción de los dibujos

- 50 La Figura 1 ilustra estructuras publicadas de las unidades de repetición de los O-antígenos de a) *Salmonella* Paratyphi A; b) *Salmonella* Typhimurium; y c) *Salmonella* Enteritidis.

La Figura 2 ilustra la estructura de la unidad de repetición de O-antígeno de *Salmonella* Paratyphi A y el dominio núcleo.

La Figura 3 muestra la separación de O:2-CRM₁₉₇ de los componentes no conjugados por Sephacryl S300HR.

- 55 La Figura 4 muestra la inmunogenicidad de diferentes conjugados O:2-CRM₁₉₇, tal como se mide por un inmunoensayo ELISA para anticuerpos anti-O:2.

La Figura 5 es un esquema de un procedimiento de conjugación de la invención aplicado a O-antígeno-núcleo.

La Figura 6 ilustra un procedimiento a gran escala para la conjugación de O-antígeno de *Salmonella* Paratyphi A con CRM₁₉₇.

La Figura 7 es un esquema de un procedimiento de conjugación de la invención aplicado al polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo X.

5 La Figura 8 muestra un análisis SDS-PAGE de conjugados de polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo X.

La Figura 9 muestra el resultado de los ensayos de actividad bactericida del suero (SBA) realizadas usando sueros agrupados el día 42 de ratones inmunizados con 8 ug de O:2 conjugado o no conjugado y cepa de *S. Paratyphi* A. Los datos están presentados como porcentaje de UFC recuperado en los sueros de ensayo con BRC activo (y en suero control con BRC inactivo) en comparación con UFC presente en el control negativo, por
10 unidad de anticuerpo de ELISA anti-O:2 de cada grupo de suero.

Modos para llevar a cabo la invención

Compendio de la producción de conjugado

Se compararon diferentes procedimientos para conjugar el O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi* con CRM₁₉₇. En particular, se compararon conjugados obtenidos activando la cadena de O:2 aleatoriamente, o específicamente a través de la subunidad de KDO terminal. Teóricamente, la activación de solamente el KDO no modificaría la estructura de los sacáridos de repetición y, por lo tanto, daría como resultado un conjugado mejor definido y más fácil de caracterizar.

20 Dos procedimientos se basaron en los procedimientos de la técnica anterior. En el primero de estos procedimientos, el O-antígeno se activó aleatoriamente con ADH usando CDAP y, a continuación, se conjugó con CRM₁₉₇ usando EDAC. En el segundo procedimiento, la región núcleo del O-antígeno se activó con ADH (usando el grupo COOH de KDO por EDAC) y, a continuación, se conjugó con CRM₁₉₇ usando EDAC.

También se ensayaron procedimientos alternativos. Un primer procedimiento implicó la activación de KDO con ADH a través del grupo cetona mediante aminación reductiva, seguido de activación con SIDEA y, a continuación, conjugación con CRM₁₉₇. Un segundo procedimiento sustituyó la ADH por CDH. Un tercer procedimiento implicó la activación de O-antígeno con SIDEA (sin activación de KDO con ADH) usando el grupo pirofosfoetanolamina sobre la región núcleo.

Conjugación de O-antígeno-núcleo a CRM₁₉₇

30 *Procedimiento (comparativo) A: Activación aleatoria de la cadena de O-antígeno-núcleo con ADH por CDAP y conjugación con CRM₁₉₇ por EDAC*

Este conjugado se sintetizó según la ref. 2, tal como se describe en detalle más adelante.

35 *Derivatización de O-antígeno-núcleo con ADH por CDAP.* Se añadieron 30 µl de CDAP (100 mg/ml de acetonitrilo) por ml de 10 mg/ml de O-antígeno-núcleo en NaCl 150 mM a temperatura ambiente. El pH se mantuvo a 5,8 a 6,0 durante 30 segundos, a continuación, se añadió TEA 0,2 M para incrementar el pH a 7,0 y la solución se mezcló a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación, se añadió 1 ml de ADH 0,8 M en NaHCO₃ 0,5 M por 10 mg de O-antígeno-núcleo. La reacción se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente, y el pH se mantuvo a 8,0 a 8,5 con NaOH 0,1 N. A continuación, se retiró la sal de la mezcla de reacción usando una columna G-25 frente a agua y el producto, designado como "OAg-(CDAP)ADH", caracterizado.

40 *Conjugación de OAg-(CDAP)ADH con CRM₁₉₇.* El OAg-(CDAP)ADH se disolvió en MES 100 mM a pH 5,8. Se añadió un peso igual de proteína para dar una relación de O-antígeno-núcleo:CRM₁₉₇ de 1:1 en peso, con una concentración de O-antígeno-núcleo de 5 mg/ml. La mezcla de reacción se colocó sobre hielo y se añadió EDAC a una concentración final de 50 mM. La reacción se mezcló sobre hielo durante unas 4 h adicionales. El conjugado resultante se designó "OAg-(CDAP)ADH-CRM₁₉₇".

Procedimiento (comparativo) B: Activación de KDO terminal con ADH por EDA y conjugación con CRM₁₉₇ por EDAC

45 Este conjugado se sintetizó según la ref. 9.

50 *Derivatización de O-antígeno-núcleo con ADH a KDO por EDAC.* El O-antígeno-núcleo se solubilizó a 3 mg/ml en MES 100 mM a pH 5,8. A continuación, se añadió ADH a una relación p/p de ADH:O-antígeno-núcleo de 1,36, seguido de EDAC a una concentración final de 3,7 mM. La reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación, se retiró la sal de la mezcla de reacción usando una columna G-25 frente a agua y el producto, designado como "OAg-(EDAC)ADH", caracterizado.

Conjugación de OAg-(EDAC)ADH con CRM₁₉₇. El conjugado se preparó según el procedimiento descrito en el Procedimiento A anterior para OAg-(CDAP)ADH. El conjugado se designó como "OAg-(EDAC)ADH-CRM₁₉₇".

Procedimientos C y D: Activación de KDO terminal con ADH (Procedimiento C) o CDH (Procedimiento D) mediante aminación reductiva y conjugación con CRM₁₉₇ por enlazador SIDEA

- Derivatización de O-antígeno-núcleo con ADH o CDH en KDO mediante aminación reductiva.* Después de ensayar las diferentes condiciones, se identificó un protocolo optimizado para la derivatización de O-antígeno-núcleo. El O-antígeno-núcleo se solubilizó a 40 mg/ml en AcONa 100 mM a pH 4,5. Se añadió o bien ADH o CDH a una relación p/p de 1:2 con respecto al O-antígeno-núcleo. A continuación, se añadió NaBH₃CN a una relación p/p de 1:2 con respecto al O-antígeno-núcleo. La solución se mezcló a 30 °C durante 1 hora. A continuación, se retiró la sal de la mezcla de reacción usando una columna G-25 frente a agua y el producto, designado como "OAg-ADH" o "OAg-CDH" caracterizado.
- 10 *Derivatización de OAg-ADH y OAg-CDH con SIDEA.* Se disolvió o bien OAg-ADH o OAg-CDH en 1:9 (v/v) agua/DMSO a una concentración final de O-antígeno-núcleo de 50 mg/ml. Una vez que el polisacárido estaba en solución, se añadió TEA para dar una relación molar de TEA/grupos NH₂ totales de 5 y, a continuación, SIDEA para dar una relación molar de SIDEA/grupos NH₂ totales de 12. La solución se mezcló a temperatura ambiente durante 3 horas. En intentos preliminares de purificar el O-antígeno-núcleo sometido a derivatización con SIDEA, el O-antígeno-núcleo se precipitó mediante la adición de AcOEt o dioxano (90 % del volumen en la solución resultante) y lavando el sedimento veces con el mismo disolvente orgánico (diez veces usando 1/3 del volumen añadido para la precipitación) para separar el SIDEA no reaccionado. A continuación, este procedimiento se adaptó para evitar el uso de AcOEt tóxico y reactivos de dioxano. Un volumen de citrato de sodio 100 mM a pH 3 igual a dos veces el volumen de la mezcla de reacción de O-antígeno-núcleo sometido a derivatización con SIDEA se añadió y se mezcló a 4 °C durante 30 min. El SIDEA no reaccionado se precipitó por el pH bajo y se separó mediante centrifugación. A continuación, el O-antígeno-núcleo sometido a derivatización con SIDEA se recuperó del sobrenadante mediante precipitación con etanol absoluto (80 % de volumen en la solución resultante). El sedimento se lavó con etanol dos veces (usando 1/3 del volumen añadido para la precipitación) y se secó. El producto, designado como "OAg-ADH-SIDEA" o "OAgCDH-SIDEA" caracterizado.
- 25 *Conjugación de OAg-ADH-SIDEA y OAg-CDH-SIDEA con CRM₁₉₇.* El OAg-ADH-SIDEA o OAg-CDH-SIDEA se solubilizó en tampón NaH₂PO₄ a pH 7,2 y se añadió CRM₁₉₇ a una concentración de proteína final de 20 mg/ml, la capacidad tampón final de 100 mM y la relación molar de grupos éster activos a CRM₁₉₇ de 30 a 1. La reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 2 horas.

Procedimiento (comparativo) E: Conjugación directa con CRM₁₉₇ por enlazador SIDEA

- 30 Las condiciones de reacción usadas en la anterior "derivatización de OAg-ADH y OAg-CDH con SIDEA" también se aplicó a O-antígeno-núcleo nativo (es decir, O-antígeno-núcleo que no se había sometido a derivatización previamente con ADH o CDH). El producto resultante se designó como "OAg-SIDEA". A continuación, se conjugó el OAg-SIDEA con CRM₁₉₇ mediante las condiciones de reacción usadas en la anterior "Conjugación de OAg-ADH-SIDEA y OAg-CDH-SIDEA con CRM₁₉₇".
- 35 Purificación de los conjugados de O-antígeno-núcleo

Los conjugados fabricados según los procedimientos A-E anteriores se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna S-300 HR 1,6 cmx90 cm eluidos a 0,5 ml/min en NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,15 M a pH 7,2. Se recogieron diferentes grupos según los perfiles de O-antígeno-núcleo y CRM₁₉₇ libre sobre la misma columna en las mismas condiciones de elución (Figura 3). El primer grupo a alto peso molecular (correspondiente al conjugado purificado) no contenía sacárido libre o proteína libre.

Análisis de los conjugados

Los conjugados se analizaron por SDS-PAGE y mostraron una esperada mancha de población de alto peso molecular en comparación con CRM₁₉₇ libre. Los conjugados se separaron de O:2 libre y CRM₁₉₇ mediante exclusión por tamaño Sephacryl S300HR (columna 1,6 x 90 cm; NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,2; flujo 0,5 ml/min). Los resultados se muestran en la Figura 3. A continuación, los conjugados purificados se caracterizan mediante el ensayo fenol sulfúrico de la ref. 209 (azúcar total), microBCA (proteína total), HPAEC-PAD (composición de azúcar) y HPLC-SEC (determinación de tamaño, Kd). Los resultados se muestran en la Tabla 1 de más adelante.

Tabla 1

Conjugado	Azúcar total, µg/ml	Presencia de O:2 libre	Proteína µg/ml	Relación p/p O:2/CRM ₁₉₇	Kd (HPLC-SEC)
O:2		sí			0,549
CRM ₁₉₇					0,690
O:2-(CDAP)ADH-CRM197 grupo 1	32,88	no	62,98	0,52	0,439

(continuación)

Conjugado	Azúcar total, µg/ml	Presencia de O:2 libre	Proteína µg/ml	Relación p/p O:2/CMR197	Kd (HPLC-SEC)
O:2-(CDAP)ADH-CRM ₁₉₇ grupo 2	101,09	sí	60,44	1,67	0,534
O:2-CDH-SIDEA-CRM ₁₉₇ Lote A	82,82	no	36,67	2,26	0,403
O:2-CDH-SIDEA-CRM ₁₉₇ Lote B	167,61	no	38,19	4,39	2 picos 0,128 0,413
O:2-ADH-SIDEA-CRM ₁₉₇ Lote A	51,54	no	29,56	1,74	2 picos 0,115 0,388
O:2-ADH-SIDEA-CRM ₁₉₇ Lote B	215,13	no	50,89	4,23	2 picos 0,118 0,421
O:2-(EDAC)ADH-CRM ₁₉₇	50,19	sí	31,31	1,60	0,52
O:2-SIDEA-CRM ₁₉₇ , grupo 1	108,57	no	52,79	2,06	0,376
O:2-SIDEA-CRM ₁₉₇ , grupo 2	185,31	Sí	68,18	2,72	0,457

Estudios de inmunogenicidad

Se usó un inmunoensayo ELISA para detectar anticuerpos anti-O:2 por ratones inmunizados con O:2-CRM₁₉₇. Para el ensayo, se revistieron placas de microtitulación MaxiSorp con 15 µg/ml de O:2 en un tampón de revestimiento de carbonato (pH 9,6) durante la noche a 4 °C.

Los conjugados O:2-CRM₁₉₇ se compararon con antígeno O:2 no conjugado. En resumen, los grupos de ratones CD1 hembras (8 por grupo a 5 semanas de vida) se inyectaron subcutáneamente con 200 µl de conjugados tal como se expone en la Tabla 2. Los ratones recibieron inmunizaciones los días 0, 14 y 28. Los sueros se recogieron de los ratones durante el transcurso del estudio y se ensayaron mediante el ensayo ELISA.

10

Tabla 2

Grupo	Vacuna	Dosis antígeno O:2, µg
1	O:2-(CDAP)ADH-CRM ₁₉₇ , grupo 1	1
2		8
3	O:2-(CDAP)ADH-CRM ₁₉₇ , grupo 2	1
4		8
5	O:2-CDH-SIDEA-CRM ₁₉₇	1
6		8
7	O:2-ADH-SIDEA-CRM ₁₉₇	1
8		8
9	O:2-(EDAC)ADH-CRM ₁₉₇	1
10		8
11	Antígeno O:2 no conjugado	8

Los resultados de ELISA del día 42 del estudio mostraron que todos los conjugados, excepto O:2-(EDAC)ADH-CRM₁₉₇ eran capaces de suscitar altos niveles en suero de anticuerpos IgG anti-O:2 en ratones cuando se administraban a la dosis de 1 µg (Figura 4). Se observaron incrementos en el anticuerpo después de la segunda vacunación con conjugado, mientras que la inmunización repetida con 8 µg de O:2-antígeno no conjugado no dio como resultado anticuerpos IgG específicos. La administración de dosis de 8 µg no era mejor que las dosis de 1 µg en generar una respuesta inmune humoral en ratones (Figura 4).

Actividad bactericida del suero

Los ensayos de actividad bactericida del suero (SBA) se realizaron usando los sueros agrupados el día 42 de ratones inmunizados con 8 µg de O:2 conjugado o no conjugado y *S. Paratyphi A* (véase la Tabla 2). El resultado se muestra en la Figura 9. La inhibición del crecimiento de *S. Paratyphi A in vitro* se correlacionó con el incremento de unidades de ELISA anti-O:2 presentes en los grupos de sueros. Se observó inhibición de crecimiento más fuerte con aquellos conjugados producidos usando una química selectiva; tanto los conjugados SIDEA como O:2-(EDAC)ADH-CRM₁₉₇ dieron como resultado inhibición incrementada en comparación con O:2-(CDAP)ADH-CRM₁₉₇, cuyo O:2 se modificó aleatoriamente antes de la conjugación. Incluso el O:2 no conjugado, aunque lejos de conseguir altos niveles de inhibición de crecimiento bacteriano debido a la menor cantidad de anticuerpo presente en los sueros, presentó un perfil de inhibición similar a los conjugados preparados con cadenas de O:2 no modificadas. No se detectó inhibición de crecimiento bacteriano usando suero control en presencia de iBRC (el mismo suero en presencia de BRC activo se muestra como control), indicando un papel para matar mediado por complemento.

Procedimiento a gran escala

Basándose en el estudio de inmunogenicidad y la facilidad de caracterización de conjugado, el procedimiento de conjugación basado en la activación de O:2 con ADH y, a continuación, SIDEA y la reacción con CRM₁₉₇ (procedimiento C, Figura 5) se seleccionó para desarrollo adicional. Los conjugados fabricados por este procedimiento eran más inmunogénicos que los conjugados fabricados por el procedimiento B, por ejemplo. Aunque los conjugados fabricados por el procedimiento A dieron títulos de ELISA comparables (Figura 4), dieron como resultado actividad bactericida del suero considerablemente menor (véase el Ejemplo y la Fig. 9). Además estos conjugados tenían una estructura entrecruzada, con múltiples posibles puntos de enlace sobre la cadena de polisacárido a una o más moléculas de proteína, con desventajas en términos de reproductibilidad y caracterización del producto. Por el contrario, los conjugados del procedimiento C contienen más cadenas de polisacárido por molécula de proteína, con solamente un punto de enlace sobre la cadena de polisacárido. El resto de la cadena de polisacárido se deja igual. La derivatización del O-antígeno-núcleo por CDAP (procedimiento A) puede dar como resultado entrecruzamiento de las cadenas de azúcar y el procedimiento de conjugación total era más complicado. El uso de EDAC en los procedimientos A y B también pueden dar como resultado entrecruzamiento de la proteína.

Un procedimiento aumentado a escala se desarrolló para el procedimiento C para la producción de mayores cantidades de conjugado (Figura 6). En particular, la etapa de aminación reductiva de O:2 con ADH se optimizó para reducir el tiempo de reacción a 1 hora (en lugar de 7-14 días tal como se ha informado previamente para este tipo de reacción [13]) con buen % de activación de O:2 (>65 %). Esta etapa se amplió a 300 mg de O:2 y se repitió varias veces con resultados reproducibles en términos de grado de rendimiento y derivatización. La recuperación era de >75 % después de la filtración de flujo tangencial, con >70 % de activación de O-antígeno-núcleo (calculado como relación molar de grupos ADH unidos por grupos GlcNAc sobre el O-antígeno-núcleo) y buena pureza (relación de ADH libre/ADH unido < 1 %). La estabilidad del intermediario O:2-ADH en solución acuosa a 4 °C se verificó que era >1 mes. Los inventores prevén reemplazar la etapa de secado por precipitación de O:2-ADH en etanol al 85 %.

La reacción de O:2-ADH con SIDEA se optimizó para evitar el uso de AcOEt durante la purificación de O:2-ADH-SIDEA. La separación de SIDEA libre mediante precipitación a pH 4-5 y, a continuación, precipitación de O:2-ADH-SIDEA en EtOH al 85 % mostró mejor formación de precipitado que era más fácil de lavar en comparación con AcOEt. Las recuperaciones >85 % se obtuvieron trabajando sobre una escala de 100 mg con grupos de NH₂ activados >80 %.

Los inventores han encontrado que además de O:2 de *S. Paratyphi A* el procedimiento de conjugación basado en la activación de O-antígeno con ADH y, a continuación, SIDEA y la reacción con CRM₁₉₇ (procedimiento C, Figura 5), funciona igualmente bien para O-antígeno-núcleo de *S. Typhimurium* y O-antígeno-núcleo de *S. Enteritidis*.

Conjugación de polisacárido capsular MenX con CRM₁₉₇

El procedimiento C también se aplicó a la conjugación de polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo X (Figura 7), dando como resultado la formación de conjugado sin proteína libre en la mezcla de reacción (Figura 8).

Efecto de pH y temperatura sobre la aminación reductiva del O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi A* con ADH como enlazador

Los experimentos resumidos en la Tabla 3 se realizaron trabajando con O-antígeno-núcleo de *S. Paratyphi A*. Se evaluó el efecto de diferente pH y diferentes temperaturas. La mejor activación se obtuvo a menor pH y era independiente de la temperatura. Las reacciones se realizaron en tampón 100 mM, con concentración de O-

antígeno-núcleo de 20 mg/ml y una relación de ADH y O-antígeno-núcleo y NaBH₃CH y O-antígeno-núcleo ambas de 1,2 a 1 (p/p). Se añadieron ADH y NaBH₃CN en el mismo momento y las soluciones se mezclaron durante 1 hora.

Tabla 3. Aminación reductiva de O:2-KDO con ADH es dependiente de pH e independiente de temperatura

Tampón	Temperatura	% O:2 activado
Acetato de sodio pH 4,5	30 °C	65,8
Acetato de sodio pH 4,5	50 °C	65,4
Acetato de sodio pH 4,5	60 °C	68,3
MES pH 6,0	30 °C	43,9
Fosfato pH 8,0	30 °C	26,2

5 **Derivatización de O-antígeno-núcleo de *S. Typhimurium* con ADH mediante aminación reductiva comparando diferentes condiciones de reacción (Tabla 4)**

Las condiciones de reacción descritas en esta solicitud (Tabla 4, procedimiento 1) para la realización de la aminación reductiva con ADH se compararon con el procedimiento tradicional informado en la bibliografía [13] (Tabla 4, procedimiento 2), funcionando con O-antígeno-núcleo de *S. Typhimurium* (cepa D23580). Los resultados se resumen en la Tabla 5, mostrando que el procedimiento a menor pH es más rápido y también más eficaz.

10 **Tabla 4. Condiciones de reacción usadas para la realización de aminación reductiva con ADH comparando el procedimiento NVGH con el procedimiento clásico informado en la bibliografía**

Procedimiento	OAg (mg/ml)	ADH (mg/ml)	NaBH ₃ CN (mg/ml)	Tampón	Temp (°C)
1	40	48	48	AcONa 100 mM pH 4,5	30
2	20	100	100	NaHCO ₃ 100 mM pH 8,3	37

Tabla 5. Aminación reductiva de O:4,5-KDO con ADH usando el procedimiento 1 es más eficaz y más rápida que usando el procedimiento clásico informado en la bibliografía (procedimiento 2)

Procedimiento	Tiempo de reacción	% O:4,5 activado
1	3 h	88
2	3 h	31,6
2	24 h	28,5
2	5 d	28,5

Referencias

- 15 [1] Watson y col. (1992) *Infect. Immun.* 60(11):4679-86.
 [2] Konadu y col. (1996) *Infect. Immun.* (7):2.709-15.
 [3] Petri y col. (2008) *J. Clin. Invest.* 118(4):1.277-90.
 [4] Ashkenazi y col. (1999) *J. Infect. Dis.* 179(6):1.565-8.
 [5] Cohen y col. (1997) *Lancet* 349(9046):155-9.
 20 [6] Passwell y col. (2003) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 22(8):701-6.
 [7] Pozsgay y col. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(36):14.478-82.
 [8] Robbins y col. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(19):7.974-8.
 [9] Taylor y col. (1993) *Infect. Immun.* 61(9):3.678-87.
 [10] Konadu y col. (1994) *Infect. Immun.* 62(11):5.048-54.
 25 [11] Ahmed y col. (2006) *J. Infect. Dis.* 193(4):515-21.
 [12] Cox y col. (2011) *Glycoconj. J.* 28 :165-182.
 [13] Chu y col. (1991) *Infect. Immun.* 59(12):4.450-58.
 [14] WO96/40242.
 [15] Lei y col. (2000) *Dev. Biol.* (Basel) 103:259-264.
 30 [16] WO00/38711; patente de EE.UU 6.146.902.
 [17] Westphal and Jann (1965) *Methods Carbohydr. Chem.* 5:83-91.

- [18] Micoli y col., 2012 *PlosOne*, in press.
- [19] Knirel y col. (2011) *Glycobiology*. (10):1.362-72.
- [20] Chhibber y col. (2005) *Indian. J. Exp. Biol.* 43(1):40-5.
- 5 [21] Gupta y col. (1992) *Infect. Immun.* 60(8):3.201-8.
- [22] Cox y col. (2005) *Vaccine*. 23(43):5.045-54.
- [23] Lemercinier and Jones (1996) *Carbohydrate Res.* 296:83-96.
- [24] Hestrin (1994) *J. Biol. Chem.* 180(1):249-61.
- [25] Kao and Tasi (2004) *Vaccine*. 22(3-4):335-44.
- [26] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- 10 [27] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl. 2:S28-36.
- [28] Buttery & Moxon (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [29] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13:113-33, vii.
- [30] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [31] Patente europea 0477508.
- 15 [32] Patente de EE.UU 5.306.492.
- [33] WO98/42721.
- [34] Dick y col. en "Conjugate Vaccines" (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [35] Hermanson "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [36] Research Disclosure, 453077 (Enero 2002).
- 20 [37] EP-A-0372501.
- [38] EP-A-0378881.
- [39] EP-A-0427347.
- [40] WO93/17712.
- [41] WO94/03208.
- 25 [42] WO98/58668.
- [43] EP-A-0471177.
- [44] WO91/01146.
- [45] Falugi y col. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:3.816-3.824.
- [46] Baraldo y col. (2004) *Infect. Immun.* 72(8):4.884-7.
- 30 [47] EP-A-0594610.
- [48] Ruan y col. (1990) *J. Immunol.* 145:3.379-3.384.
- [49] WO00/56360.
- [50] Kuo y col. (1995) *Infect. Immun.* 63:2.706-13.
- [51] Michon y col. (1998) *Vaccine*. 16:1.732-41.
- 35 [52] WO02/091998.
- [53] WO01/72337.
- [54] WO00/61761.
- [55] WO00/33882.
- [56] WO99/42130.
- 40 [57] Canh y col. (2004) *Infect. Immun.* 72(11):6.586-8.
- [58] Rondini y col. (2011) *Clin. Vaccine Immunol.* 18(3):460-8.
- [59] Micoli y col. (2011) *Vaccine*. 29(4):712-20.
- [60] WO 2009/150543.
- [61] Watson (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:331-332.
- 45 [62] Rubin (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:269-285, v.
- [63] Jedrzejewski (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:187-207.
- [64] Vaccines (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- [65] Bell (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:1.187-1.188.
- [66] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- 50 [67] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Supl:S63-68 & 79-80.
- [68] Hsu y col. (1999) *Clin. Liver Dis.* 3:901-915.
- [69] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [70] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [71] WO02/02606.
- 55 [72] Kalman y col. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [73] Read y col. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:1.397-406.
- [74] Shirai y col. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Supl 3):S524-S527.
- [75] WO99/27105.
- [76] WO00/27994.
- 60 [77] WO00/37494.
- [78] WO99/28475.
- [79] Ross y col. (2001) *Vaccine* 19:4.135-4.142.
- [80] Sutter y col. (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:287-308.
- [81] Zimmerman & Spann (1999) *Am. Fam. Physician* 59:113-118, 125-126.
- 65 [82] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl:S2-6.
- [83] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 enero 16;47(1):12, 19.

- [84] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-107.
 [85] WO02/34771.
 [86] Dale (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13:227-43, viii.
 [87] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4.658-4.663.
 5 [88] WO03/093306.
 [89] WO2004/018646.
 [90] WO2004/041157.
 [91] Ichiman and Yoshida (1981) *J. Appl. Bacteriol.* 51:229.
 [92] US4197290.
 10 [93] Ichiman y col. (1991) *J. Appl. Bacteriol.* 71:176.
 [94] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
 [95] Donnelly y col. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15:617-648.
 [96] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin. Investig. Drugs* 9:471-480.
 [97] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr. Opin. Mol Ther.* 2:441-447.
 15 [98] Ilan (1999) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1:116-120.
 [99] Dubensky y col. (2000) *Mol. Med.* 6:723-732.
 [100] Robinson & Pertmer (2000) *Adv. Virus Res.* 55:1-74.
 [101] Donnelly y col. (2000) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162(4 Pt 2):S190-193.
 [102] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
 20 [103] Paoletti y col. (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
 [104] WO00/56365.
 [105] Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy". 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [106] WO03/009869.
 [107] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
 25 [108] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J. Exp. Biol.* 37:6-16.
 [109] WO00/53221.
 [110] Jakobsen y col. (2002) *Infect. Immun.* 70:1.443-1.452.
 [111] Bergquist y col. (1998) *APMIS* 106:800-806.
 [112] Baudner y col. (2002) *Infect. Immun.* 70:4.785-4.790.
 30 [113] Ugozzoli y col. (2002) *J. Infect. Dis.* 186:1.358-1.361.
 [114] WO90/14837.
 [115] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:197-203.
 [116] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2.673-2.680.
 [117] "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995
 35 (ISBN0-306-44867-X).
 [118] "Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols" (Volume 42 de "Methods in Molecular
 Medicine series"). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [119] Allison & Byars (1992) *Res. Immunol.* 143:519-25.
 [120] Hariharan y col. (1995) *Cancer Res.* 55:3486-9.
 40 [121] US-2007/014805.
 [122] WO95/11700.
 [123] patente de EE.UU 6.080.725.
 [124] WO2006/113373.
 [125] WO2005/097181.
 45 [126] US 5.057.540.
 [127] WO96/33739.
 [128] EP-A-0109942.
 [129] WO96/11711.
 [130] WO00/07621.
 50 [131] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [132] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 [133] EP-A-0689454.
 [134] Johnson y col. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2.273-2.278.
 [135] Evans y col. (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:219-229.
 55 [136] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2.485-2.491.
 [137] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 [138] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2.393-2.400.
 [139] WO02/26757.
 [140] WO99/62923.
 60 [141] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 [142] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 [143] WO98/40100.
 [144] US 6.207.646.
 [145] US 6.239.116.
 65 [146] US 6.429.199.
 [147] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.

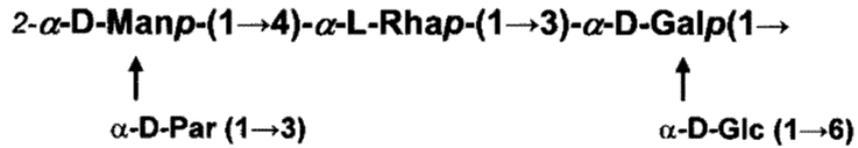
- [148] Blackwell y col. (2003) *J. Immunol* 170:4.061-4.068.
- [149] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [150] WO01/95935.
- 5 [151] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [152] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [153] WO03/035836.
- [154] Schellack y col. (2006) *Vaccine* 24:5.461-72.
- [155] Lingnau y col. (2007) *Expert Rev. Vaccines* 6:741-6.
- 10 [156] WO2004/084938.
- [157] WO95/17211.
- [158] WO98/42375.
- [159] Beignon y col. (2002) *Infect. Immun.* 70:3.012-3.019.
- [160] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2.534-2.541.
- [161] Pizza y col. (2000) *Int. J. Med. Microbiol.* 290:455-461.
- 15 [162] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:5.306-5.313.
- [163] Ryan y col. (1999) *Infect. Immun.* 67:6.270-6.280.
- [164] Partidos y col. (1999) *Immunol. Lett* 67:209-216.
- [165] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:285-293.
- [166] Pine y col. (2002) *J. Control Release* 85:263-270.
- 20 [167] Tebbey y col. (2000) *Vaccine* 18:2.723-34.
- [168] Domenighini y col. (1995) *Mol. Microbiol.* 15:1.165-1.167.
- [169] WO99/40936.
- [170] WO99/44636.
- [171] Singh y col] (2001) *J. Cont. Release* 70:267-276.
- 25 [172] WO99/27960.
- [173] US 6.090.406.
- [174] US 5.916.588.
- [175] EP-A-0626169.
- [176] Stanley (2002) *Clin. Exp. Dermatol.* 27:571-577.
- 30 [177] Jones (2003) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4:214-218.
- [178] WO99/11241.
- [179] WO94/00153.
- [180] WO98/57659.
- [181] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- 35 [182] Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy". 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [183] "Methods In Enzymology" (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [184] "Handbook of Experimental Immunology", Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications).
- [185] Sambrook y col. (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 40 [186] "Handbook of Surface and Colloidal Chemistry" (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997).
- [187] Ausubel y col. (eds) (2002) "Short protocols in molecular biology", 5ª edición (Current Protocols).
- [188] "Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course", (Ream y col., eds., 1998, Academic Press).
- 45 [189] "PCR (Introduction to Biotechniques Series)", 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag).
- [190] Geysen y col. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [191] Carter (1994) *Methods Mol. Biol.* 36:207-23.
- [192] Jameson, BA y col. 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- [193] Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- 50 [194] Bublil y col. (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
- [195] De Lalla y col. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [196] Kwok y col. (2001) *Trends Immunol.* 22:583-88.
- [197] Brusica y col. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30.
- [198] Meister y col. (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
- 55 [199] Roberts y col. (1996) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12(7):593-610.
- [200] Maksyutov & Zagrebelaya (1993) *Comput. Appl. Biosci.* 9(3):291-7.
- [201] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6.311):720-1.
- [202] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- [203] Welling y col. (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- 60 [204] Davenport y col. (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
- [205] Tsurui & Takahashi (2007) *J. Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
- [206] Tong y col. (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
- [207] Schirle y col. (2001) *J. Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
- [208] Chen y col. (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
- 65 [209] Dubois y col. (1956) *Analytical Chemistry* 28:350.

REIVINDICACIONES

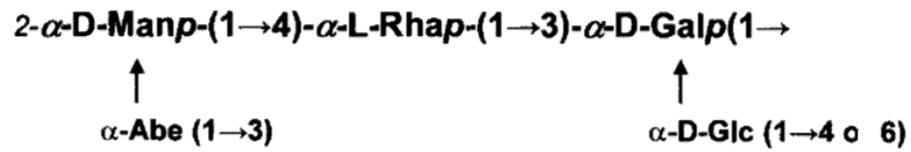
1. Un procedimiento de aminación reductiva de un grupo carbonilo en el terminal reductor de un polisacárido, en el que el polisacárido comprende un dominio núcleo y un O-antígeno de un lipopolisacárido de una bacteria Gram-negativa unido al dominio núcleo, en el que la aminación reductiva se lleva a cabo a un pH entre 4 y 5.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el grupo carbonilo está dentro de una subunidad de KDO en el terminal reductor del polisacárido.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el lipopolisacárido es de una bacteria de *Salmonella*.
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el lipopolisacárido es de *S. Paratyphi A*, *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*.
- 15 5. Un procedimiento de preparación de un conjugado de un polisacárido y una molécula portadora, que comprende las etapas de: (a) acoplar del polisacárido a un enlazador, para formar un compuesto polisacárido-enlazador en el que el terminal libre del enlazador es un grupo éster; y (b) hacer reaccionar el grupo éster con un grupo amino primario en la molécula portadora, para formar un conjugado polisacárido-enlazador-molécula portadora en el que el enlazador se acopla a la molécula portadora por un enlace de amida, en el que el polisacárido comprende un dominio núcleo de un lipopolisacárido de una bacteria Gram-negativa, en el que la etapa (a) tiene lugar con un enlazador adicional que se usa para someter a derivatización el polisacárido antes de acoplarse al enlazador y en el que el enlazador adicional tiene un grupo amino primario en ambos terminales y el polisacárido se acopla al enlazador adicional usando un grupo carbonilo en el terminal reductor del polisacárido mediante un procedimiento que comprende dos etapas: (a₁) hacer reaccionar el grupo carbonilo con uno de los grupos amino primario en el enlazador adicional mediante aminación reductiva a un pH entre 4 y 5 para formar un compuesto polisacárido-enlazador adicional en el que el polisacárido se acopla al enlazador adicional por un enlace C-N; y (a₂) hacer reaccionar el terminal libre del enlazador adicional con el enlazador.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el enlazador tiene un grupo éster en ambos terminales y el polisacárido se acopla al enlazador mediante hacer reaccionar uno de los grupos éster con un grupo amino primario en el dominio núcleo mediante sustitución de acil nucleófilo, para formar un compuesto polisacárido-enlazador en el que el polisacárido se acopla al enlazador por un enlace amida.
- 25 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el lipopolisacárido es de *S. Paratyphi A*, *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* y el grupo amino primario está dentro de un grupo pirofosfoetanolamino.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la molécula portadora es una toxina de difteria o tétanos, o toxoide o mutante de los mismos.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la molécula portadora es mutante de toxina de difteria CRM₁₉₇.
10. Un conjugado de un polisacárido y una molécula portadora obtenido u obtenible mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
- 35 11. Un procedimiento de reducción de la contaminación de un compuesto polisacárido-enlazador obtenido u obtenible durante el procedimiento de cualquier de las reivindicaciones 5 a 9 con enlazador no reaccionado, que comprende una etapa de precipitación del enlazador no reaccionado bajo condiciones acuosas a un pH menor de 5.

FIGURA 1

A)



B)



C)

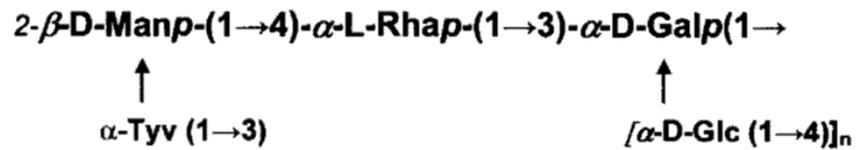


FIGURA 3

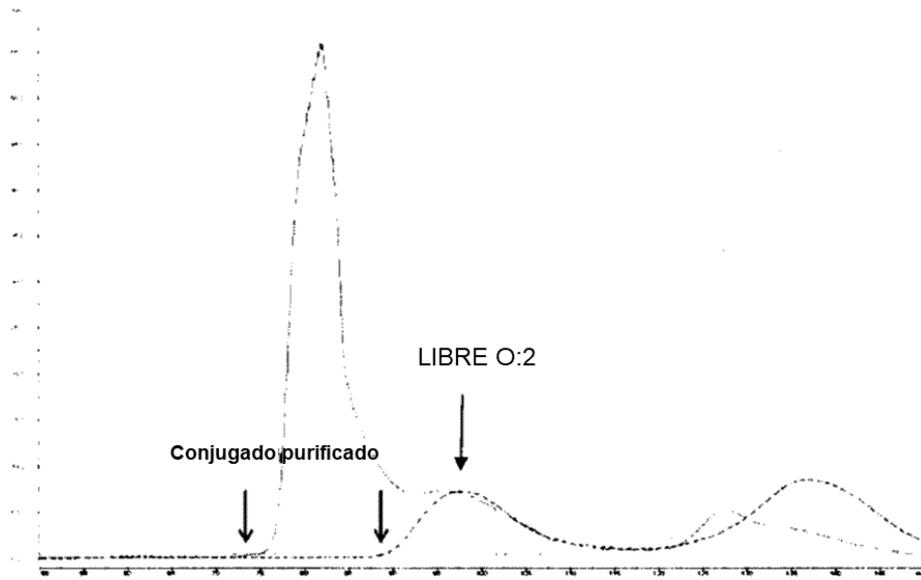


FIGURA 4

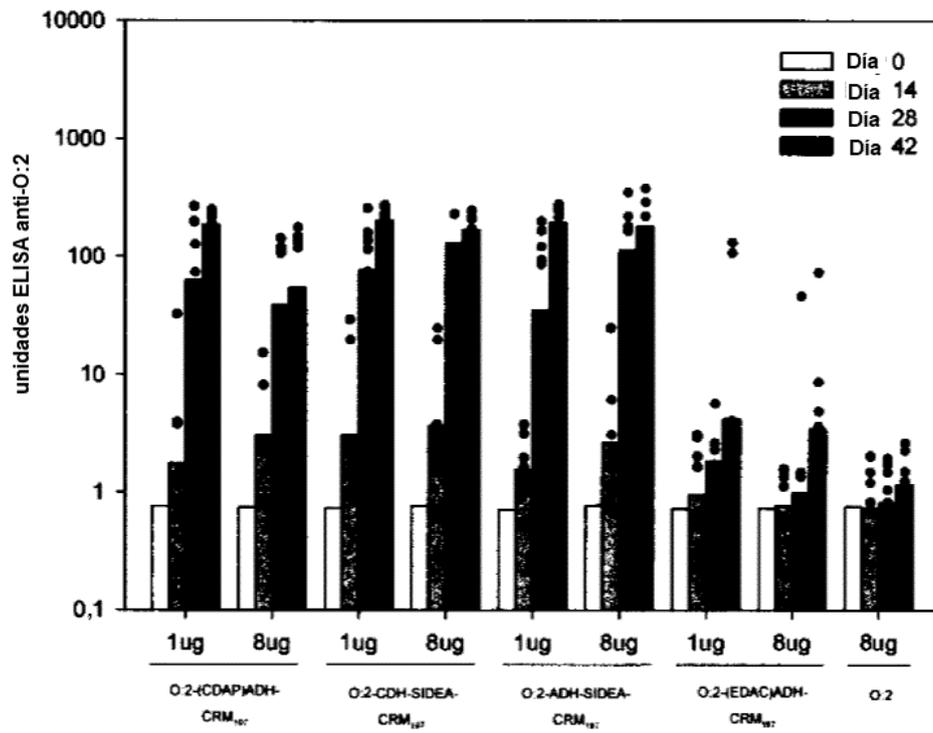


FIGURA 5

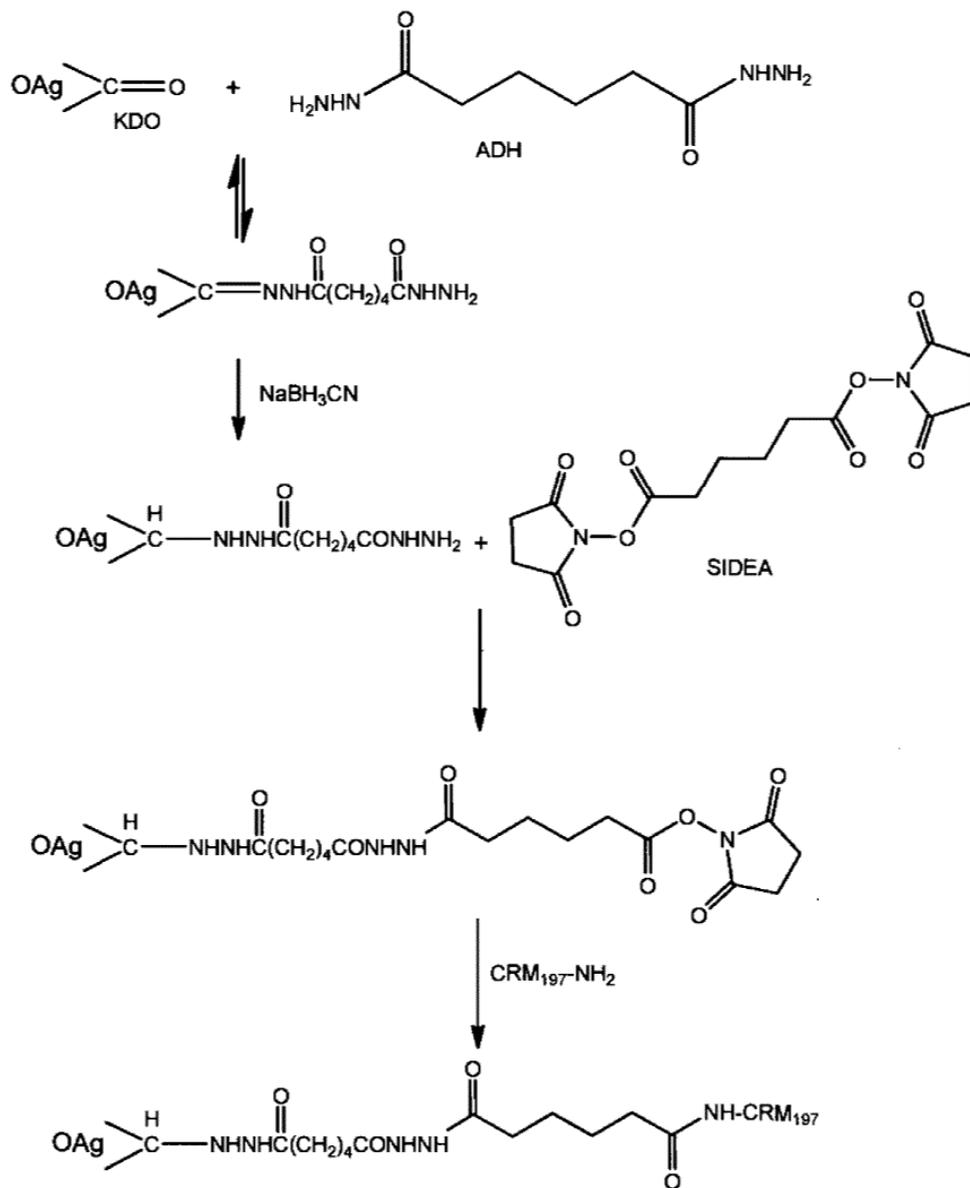


FIGURA 6

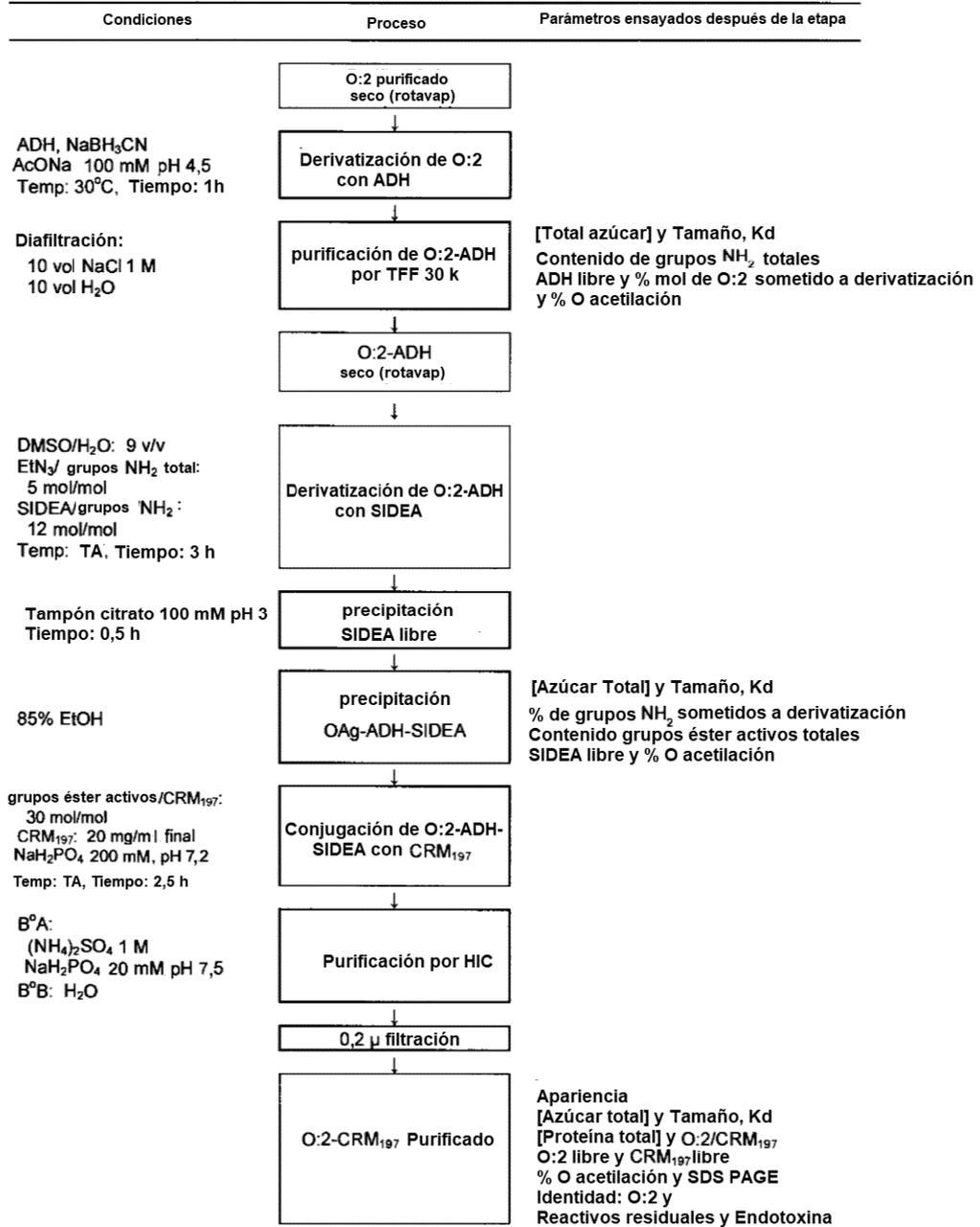


FIGURA 7

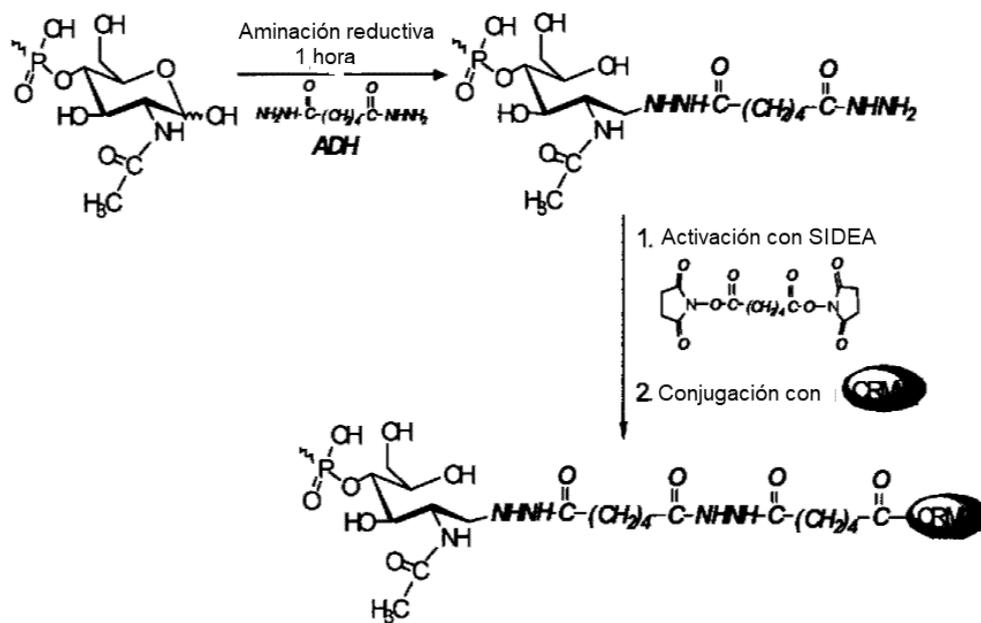
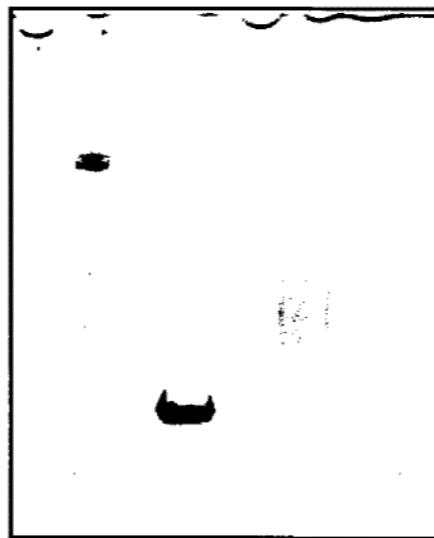


FIGURA 8



1 2 3

- 1. Marcador
- 2. CRM₁₉₇
- 3. Mezcla conj. MenX-CRM₁₉₇

FIGURA 9

