

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 495 744**

(51) Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**C08B 37/00** (2006.01)  
**C12P 19/04** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2008 PCT/IB2008/003582**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09077854**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08862064 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **31.01.2018 EP 2227248**

---

(54) Título: **Glucanos con adyuvante**

(30) Prioridad:

**26.11.2007 US 4396 P  
01.07.2008 US 133738 P**

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

**26.04.2018**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**BERTI, FRANCESCO;  
COSTANTINO, PAOLO y  
ROMANO, MARIA ROSARIA**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**DESCRIPCIÓN****Glucanos con adyuvante**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. con nº de serie 61/004.396, presentada el 26 de noviembre de 2007; y la solicitud provisional de EE.UU. con nº de serie 61/133.738, presentada el 1 de julio de 2008.

5

**Campo técnico**

La invención se refiere a vacunas, más concretamente a aquellas contra enfermedades e infecciones fúngicas.

**Antecedentes de la invención**

El uso de  $\beta$ -glucanos como vacunas antifúngicas se revisa en la referencia 1.

10 La referencia 2 informa acerca del uso de diversos  $\beta$ -glucanos en estudios de inmunización, incluidos laminarina, pustulano y 'GG-zym' (glucanos solubles de *C. albicans* obtenidos por digestión de fantasmas de glucano con  $\beta$ -1,3-glucanasa). Se conjugaron los glucanos GG-zym y laminarina con proteínas transportadoras para mejorar su inmunogenicidad. En la referencia 3 se proporciona información adicional sobre la laminarina conjugada.

15 En la referencia 2 se administró el conjugado de GG-zym con los adyuvantes completo e incompleto de Freund. Más generalmente, las composiciones que contienen  $\beta$ -glucano se describen como que contienen opcionalmente adyuvantes. En la referencia 3 el conjugado de laminarina se administró con adyuvante completo de Freund o con adyuvante de toxina del cólera.

Es un objeto de la invención proporcionar composiciones a base de glucano adicionales y mejores para inducir respuestas inmunitarias protectoras y/o terapéuticas contra las infecciones.

**20 Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones inmunógenas que comprenden un glucano que contiene exclusivamente enlaces  $\beta$ -1,3, en las que dicho glucano es una especie molecular única y está conjugado con una proteína transportadora, y en las que el glucano comprende una o más secuencias de al menos cinco residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos sólo mediante enlaces  $\beta$ -1,3. La proteína transportadora en las composiciones inmunógenas de la invención es un toxoide o toxina bacteriana, o un mutante de los mismos. En una forma de realización concreta, la proteína transportadora es CRM 197.

25

En determinadas formas de realización, el glucano tiene un peso molecular inferior a 100 kDa (por ejemplo, inferior a 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 o 15 kDa). En otras formas de realización, el glucano tiene 60 o menos unidades de monosacárido glucosa.

30 El glucano tiene exclusivamente enlaces  $\beta$ -1,3. En una forma de realización concreta, el glucano es un curdlan. Las composiciones inmunógenas de la invención pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 La composición puede comprender un adyuvante. El adyuvante puede comprender uno o más de una sal de aluminio, tal como un hidróxido de aluminio; una emulsión de aceite en agua; un oligonucleótido inmunoestimulador; y/o una  $\alpha$ -glucosilceramida. El adyuvante puede comprender una vesícula de membrana externa (OMV, forma siglada de *outer membrane vesicle*). El adyuvante puede comprender un oligonucleótido inmunoestimulador y un oligopéptido poliactílico.

La presente invención también se refiere a procedimientos para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una composición de la invención.

**Breve descripción de los dibujos**

40 La Figura 1 muestra una SDS-PAGE de los sacáridos y los conjugados. Las calles son: (1) CRM197; (2) laminarina conjugada con CRM197; (3) curdlan hidrolizado conjugado con CRM197; (4) monómero del toxoide tetánico, Tt; (5) laminarina conjugada con Tt; (6) curdlan hidrolizado conjugado con Tt.

45 La Figura 2 muestra los perfiles de SEC-HPLC para los conjugados. La Figura 2A muestra los perfiles para los conjugados de CRM197, y la Figura 2B muestra los perfiles para los conjugados de Tt. El pico más a la derecha en ambos casos es el perfil del transportador no conjugado. El pico más bajo es un conjugado de curdlan. El tercer pico es un conjugado de laminarina.

La Figura 3 muestra el análisis de HPLC-SEC de CRM197 antes y después de la conjugación con la laminarina.

La Figura 4 resume la conjugación de glucanos sintéticos.

La Figura 5 muestra un análisis de SDS-PAGE de conjugados de glucanos sintéticos.

- La Figura 6 muestra los perfiles de SEC-HPLC para los lotes 9 y 10 de conjugado de laminarina.
- La Figura 7 muestra la GMT (forma siglada de *geometric mean titer*: media geométrica de los títulos) de IgG contra conjugados de laminarina con los adyuvantes, de izquierda a derecha: (1) hidróxido de aluminio; (2) hidróxido de aluminio + oligonucleótidos CpG; (3) MF59; (4) IC31, a dosis elevada (49,5 µl de una muestra con más de 1.000 nmol/ml de oligodesoxinucleótido y 40 nmol/ml de péptido); (5) IC31, a dosis baja (90 µl de una muestra con más de 100 nmol/ml de oligodesoxinucleótido y 4 nmol/ml de péptido); (6) α-galactosilceramida; o (7) α-galactosilceramida + hidróxido de aluminio.
- La Figura 8 muestra la GMT de IgG contra laminarina conjugada con CRM197 o con toxoide tetánico combinada con diversos adyuvantes individuales y combinados, administrada por vía intrapertioneal.
- La Figura 9 muestra la GMT de IgG contra laminarina conjugada con CRM197 o con toxoide tetánico combinada con diversos adyuvantes individuales y combinados, administrada por vía subcutánea.
- La Figura 10 muestra la GMT de IgG contra curdlan conjugado con CRM197 o con toxoide tetánico combinado con diversos adyuvantes individuales y combinados, administrado por vía intrapertioneal.
- La Figura 11 muestra la GMT de IgG contra curdlan conjugado con CRM197 o con toxoide tetánico combinado con diversos adyuvantes individuales y combinados, administrado por vía subcutánea.
- La Figura 12 muestra la GMT de IgG contra conjugados de laminarina a diversas dosis de sacárido.
- La Figura 13 muestra la GMT de IgG contra conjugados de curdlan en solitario o combinados con adyuvantes individuales, a diversas dosis de sacárido.
- La Figura 14 muestra la GMT de IgG (anti-GGZym y anti-laminarina) contra conjugados de laminarina en solitario o combinados con adyuvantes individuales, a diversas dosis de sacárido.
- La Figura 15 muestra la GMT de IgG (anti-GGZym) contra conjugados de laminarina combinados con diversos adyuvantes individuales, administrados por vía intrapertioneal, subcutánea o intramuscular.
- La Figura 16 muestra la GMT de IgG (anti-laminarina) contra conjugados de laminarina combinados con diversos adyuvantes individuales administrados por vía intrapertioneal, subcutánea o intramuscular.
- La Figura 17 muestra la acumulación de *C. albicans* en los riñones de ratones tratados con los sueros preinmunización y postinmunización de ratones tratados con conjugados de laminarina combinados con diversos adyuvantes individuales.
- La Figura 18 muestra la acumulación de *C. albicans* en los riñones de ratones tratados con los sueros preinmunización y postinmunización de ratones tratados con conjugados de laminarina combinados con el adyuvante MF59.
- La Figura 19 muestra el espectro de UV de una laminarina disponible en el mercado extraída de *Laminaria digitata* y los espectros del mismo material después de una, dos o tres etapas de filtración utilizando un filtro de profundidad.
- La Figura 20 muestra la estabilidad de las formulaciones líquidas de conjugados de glucano a 37 °C combinados con diversos adyuvantes.
- La Figura 21 muestra la estabilidad de las formulaciones líquidas de conjugados de glucano a 2-8 °C combinados con diversos adyuvantes.
- La Figura 22 muestra la estabilidad de las formulaciones liofilizadas de conjugados de glucano a 4, 25 o 37 °C.
- La Figura 23 muestra la GMT de IgG (anti-laminarina) contra conjugados de laminarina y glucano sintético en solitario o combinados con diversos adyuvantes individuales y combinados, administrados por vía intrapertioneal.
- La Figura 24 muestra la tasa de supervivencia de los ratones tratados con laminarina conjugada con CRM197 combinada con MF59 o CRM197 y MF59 en solitario antes de la provocación con *C. albicans*.
- La Figura 25 muestra la tasa de supervivencia de los ratones tratados con curdlan conjugado con CRM197 combinado con MF59 o MF59 en solitario antes de la provocación con *C. albicans*.
- La Figura 26 muestra la tasa de supervivencia de los ratones tratados con dos conjugados de glucano sintético combinados con MF59 o MF59 en solitario antes de la provocación con *C. albicans*.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un glucano que contiene exclusivamente enlaces  $\beta$ -1,3, en la que dicho glucano es una especie molecular única y está conjugado con una proteína transportadora, y en la que el glucano comprende una o más secuencias de al menos cinco residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos sólo mediante enlaces  $\beta$ -1,3, en la que la proteína transportadora es toxoide o toxina bacteriana, o un mutante de los mismos. Los autores de la invención han descubierto que los glucanos que son especies moleculares únicas pueden ser más inmunogénicos que los glucanos más polidispersos, particularmente cuando la composición comprende también un adyuvante. Por lo tanto, la composición comprende preferentemente un adyuvante además del glucano.

10 ***El glucano***

Los glucanos son polisacáridos que contienen glucosa que se encuentran *inter alia* en las paredes de las células fúngicas. Los  $\alpha$ -glucanos incluyen uno o más enlaces  $\alpha$  entre las subunidades de glucosa, mientras que los  $\beta$ -glucanos incluyen uno o más enlaces  $\beta$  entre las subunidades de glucosa. El glucano utilizado en conformidad con la invención incluye enlaces  $\beta$ -1,3.

## 15 El glucano es lineal.

Los  $\beta$ -glucanos naturales de longitud completa son insolubles y tienen un peso molecular en el rango de los megadaltons. Resulta preferente utilizar glucanos solubles en las composiciones inmunógenas de la invención. La solubilización puede conseguirse fragmentando glucanos insolubles largos. Esto puede conseguirse mediante hidrólisis o, más convenientemente, mediante digestión con una glucanasa (por ejemplo, con una  $\beta$ -1,6-glucanasa).  
20 Como alternativa, pueden prepararse sintéticamente glucanos cortos uniendo unidades estructurales de monosacáridos.

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

El glucano puede ser un glucano fúngico. Un 'glucano fúngico' se obtiene generalmente a partir de un hongo pero, cuando se encuentra una estructura concreta de glucano tanto en hongos como en no hongos (por ejemplo, en bacterias, plantas inferiores o algas), puede utilizarse el organismo no fúngico como fuente alternativa. Por lo tanto, el glucano puede provenir de la pared celular de una *Candida*, tal como *C. albicans*, o de *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Pythium insidiosum*.

35 Existen diversas fuentes de  $\beta$ -glucanos fúngicos. Por ejemplo, se dispone en el mercado de  $\beta$ -glucanos puros por ejemplo, el pustulano (Calbiochem) es un  $\beta$ -1,6-glucano purificado a partir de *Umbilicaria papullosa*. Los  $\beta$ -glucanos pueden purificarse a partir de paredes de las células fúngicas de diversas maneras. En la referencia 7, por ejemplo, se describe un procedimiento de dos etapas para preparar un extracto de  $\beta$ -glucano soluble en agua de *Candida*, libre de manano de la pared celular, que implica la oxidación con NaClO y la extracción con DMSO. El producto resultante (' $\beta$ -D-glucano soluble de *Candida*' o 'CSBG' (forma siglada de *candida soluble  $\beta$ -D-glucan*) se compone principalmente de un  $\beta$ -1,3-glucano lineal con un resto  $\beta$ -1,6-glucano lineal. Asimismo, en la referencia 2 se describe la producción de GG-zym a partir de *C. albicans*. Tales glucanos de *C. albicans*, incluyen (a)  $\beta$ -1,6-glucanos con cadenas laterales de  $\beta$ -1,3-glucano y un grado medio de polimerización de aproximadamente 30, y (b)  $\beta$ -1,3-glucanos con cadenas laterales de  $\beta$ -1,6-glucano y un grado medio de polimerización de aproximadamente 4.

40 El glucano es un  $\beta$ -1,3 glucano. Las laminarinas se encuentran en las algas pardas y algas marinas. Las relaciones  $\beta$ (1-3): $\beta$ (1-6) de las laminarinas varían entre las diferentes fuentes, por ejemplo es tan baja como 3:2 en la laminarina de *Eisenia bicyclis*, pero tan alta como 7:1 en la laminarina de *Laminaria digitata* [8]. Por lo tanto, el glucano utilizado con la invención puede tener una relación  $\beta$ (1-3): $\beta$ (1-6) de entre 1,5:1 y 7,5:1, por ejemplo aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 o 7:1. Opcionalmente, el glucano puede tener una subunidad de manitol terminal, por ejemplo un residuo de manitol con enlaces 1,1- $\alpha$  [9]. El glucano también puede comprender subunidades de manosa.

45 El glucano tiene exclusivamente enlaces  $\beta$ -1,3. Los autores de la invención han descubierto que estos glucanos pueden ser más inmunogénicos que los glucanos que comprenden otros enlaces, particularmente los glucanos que comprenden enlaces  $\beta$ -1,3 y una mayor proporción de enlaces  $\beta$ -1,6. Por lo tanto, el glucano se hace únicamente de residuos de glucosa con enlaces  $\beta$ -1,3 (por ejemplo,  $\beta$ -D-glucopiranosas lineales con enlaces exclusivamente 1,3).  
50 Sin embargo, opcionalmente, el glucano puede incluir residuos de monosacárido que no sean residuos de glucosa con enlaces  $\beta$ -1,3, por ejemplo puede incluir residuos de glucosa con enlaces  $\beta$ -1,6. La relación entre residuos de glucosa con enlaces  $\beta$ -1,3 y estos otros residuos debe ser al menos 8:1 (por ejemplo  $\geq$ 9:1,  $\geq$ 10:1,  $\geq$ 11:1,  $\geq$ 12:1,  $\geq$ 13:1,  $\geq$ 14:1,  $\geq$ 15:1,  $\geq$ 16:1,  $\geq$ 17:1,  $\geq$ 18:1,  $\geq$ 19:1,  $\geq$ 20:1,  $\geq$ 25:1,  $\geq$ 30:1,  $\geq$ 35:1,  $\geq$ 40:1,  $\geq$ 45:1,  $\geq$ 50:1,  $\geq$ 75:1,  $\geq$ 100:1, etc.).

Existen una o más secuencias (por ejemplo,  $\geq 1, \geq 2, \geq 3, \geq 4, \geq 5, \geq 6, \geq 7, \geq 8, \geq 9, \geq 10, \geq 11, \geq 12$ , etc.) de al menos cinco (por ejemplo  $\geq 5, \geq 6, \geq 7, \geq 8, \geq 9, \geq 10, \geq 11, \geq 12, \geq 13, \geq 14, \geq 15, \geq 16, \geq 17, \geq 18, \geq 19, \geq 20, \geq 30, \geq 40, \geq 50, \geq 60$ , etc.)

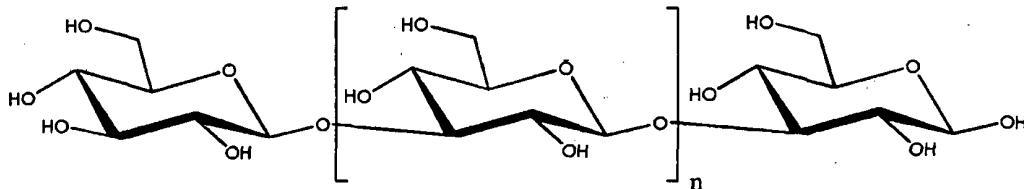
5 residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos sólo mediante enlaces  $\beta$ -1,3. "No terminal" se refiere a que el residuo no está presente en un extremo libre del glucano. En algunas formas de realización, los residuos no terminales adyacentes pueden no incluir ningún residuo acoplado a una molécula transportadora, conector u otro espaciador como se describe más adelante. Los autores de la invención han descubierto que la presencia de cinco residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos sólo mediante enlaces  $\beta$ -1,3 puede proporcionar una respuesta de anticuerpos protectora, por ejemplo, contra *C. albicans*.

10 Cuando un  $\beta$ -glucano incluye enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 en una relación y/o secuencia deseada, este glucano puede encontrarse en la naturaleza (por ejemplo, un laminarina) o puede generarse artificialmente. Por ejemplo, puede generarse mediante síntesis química, en parte o en su totalidad. Los procedimientos para la síntesis química de  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6 glucanos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo a partir de las referencias 10-20. También puede generarse un  $\beta$ -glucano que incluya enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 en una relación deseada partiendo de un glucano disponible y tratándolo con una  $\beta$ -1,6-glucanasa (también conocida como glucano endo-1,6- $\beta$ -glucosidasa, 1,6- $\beta$ -D-glucano glucanohidrolasa, etc.; EC 3.2.1.75) o una  $\beta$ -1,3-glucanasa (tal como una exo-1,3-glucanasa (EC 3.2.1.58) o una endo-1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39) hasta alcanzar una relación y/o secuencia deseada.

15 Cuando se desee un glucano que contenga exclusivamente glucosa con enlaces  $\beta$ -1,3, el tratamiento con  $\beta$ -1,6-glucanasa puede continuarse hasta su finalización, ya que la  $\beta$ -1,6-glucanasa producirá finalmente  $\beta$ -1,3 glucano puro. Sin embargo, más convenientemente, puede utilizarse un  $\beta$ -1,3-glucano puro. Estos pueden generarse sintéticamente, mediante síntesis química y/o enzimática, por ejemplo utilizando una (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucano sintasa, de las que se conocen varias de muchos organismos (incluyendo bacterias, levaduras, plantas y hongos). Los procedimientos para la síntesis química de  $\beta$ -1,3 glucanos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo a partir de las referencias 21-24. Como alternativa útil a la síntesis, puede utilizarse un  $\beta$ -1,3-glucano natural, tal como un curdlan ( $\beta$ -1,3-glucano lineal de un *Agrobacterium* anteriormente conocido como *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*; disponible en el mercado por ejemplo en el catálogo C7821 de Sigma-Aldrich) o paramilon ( $\beta$ -1,3-glucano de *Euglena*). En la técnica se conocen organismos que producen altos niveles de  $\beta$ -1,3-glucanos, por ejemplo el *Agrobacterium* de las ref. 25 y 26, o la *Euglena gracilis* de la ref. 27.

20 La laminarina y el curdlan se encuentran por lo general en la naturaleza como polímeros de alto peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de al menos 100 kDa. Suelen ser insolubles en medios acuosos. Por lo tanto, no son muy adecuados para la inmunización en sus formas naturales. Por lo tanto, la invención puede utilizar un glucano 25 más corto, por ejemplo los que contienen 60 o menos unidades de monosacárido glucosa (por ejemplo, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4). Puede utilizarse un glucano con un número de residuos de glucosa en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 20-40 unidades de glucosa. 30 Resulta particularmente útil un glucano con 25-30 residuos de glucosa. Pueden formarse glucanos adecuados por ejemplo mediante hidrólisis ácida de un glucano natural, o mediante digestión enzimática por ejemplo con una glucanasa, tal como  $\beta$ -1,3-glucanasa. También resulta útil un glucano con 11-19, por ejemplo, 13-19 y particularmente 15 o 17, unidades de monosacárido glucosa. En particular, se prevén específicamente glucanos con 35 la estructura (A), para su uso en la presente invención:

(A)



40 en la que  $n+2$  se encuentra en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 2-40. Preferentemente,  $n+2$  se encuentra en el intervalo de 25-30 u 11-19, por ejemplo, 13-17. Los autores de la invención han descubierto que resulta adecuado un  $n+2 = 15$ .

45 El glucano (tal como se ha definido anteriormente) es una especie molecular única. En esta forma de realización, todas las moléculas de glucano son idénticas en términos de secuencia. Por consiguiente, todas las moléculas de glucano son idénticas en términos de sus propiedades estructurales, incluido el peso molecular, etc. Por lo general, esta forma de glucano se obtiene mediante síntesis química, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Por ejemplo, en la referencia 22 se describe la síntesis de una especie única con enlaces  $\beta$ -1,3. Como alternativa, en otras formas de realización, el glucano puede obtenerse a partir de un glucano natural, por ejemplo, un glucano de *L. digitata*, *Agrobacterium* o *Euglena*, tal como se ha descrito anteriormente, purificando el glucano hasta obtener las especies moleculares únicas requeridas. Se dispone en el mercado de glucanos naturales que se han purificado de esta manera. Puede identificarse un glucano que sea una especie molecular única midiendo la polidispersidad (Mw/Mn) de la muestra de glucano. Este parámetro puede medirse convenientemente 50

mediante SEC-MALLS, por ejemplo como se describe en la referencia 28. Los glucanos adecuados para su uso en esta forma de realización de la invención tienen una polidispersidad de aproximadamente 1, por ejemplo, de 1,01 o menos.

5 Puede aumentarse la solubilidad de los glucanos naturales, tales como el curdlan, introduciendo grupos iónicos (por ejemplo, mediante sulfatación, particularmente en O-6 en el curdlan). Pueden utilizarse tales modificaciones con la invención, pero lo ideal es evitarlas, ya que pueden modificar la antigenicidad del glucano.

Cuando los glucanos se aislan a partir de fuentes naturales, pueden aislarse en combinación con contaminantes. Por ejemplo, los autores de la invención han descubierto que los glucanos pueden estar contaminados con florotanino, que puede identificarse mediante espectroscopia en el ultravioleta-visible (UV/VIS). Este problema es 10 particularmente común cuando el glucano se aísla a partir de un alga parda o alga marina. Por ejemplo, el espectro de UV de una laminarina disponible en el mercado extraída de *Laminaria digitata* incluye un pico de absorción resultante de la presencia de contaminación por florotanino (Figura 16). Asimismo, los glucanos extraídos de *Artic laminarialis*, *Saccorhiza dermatodea* y *Alaria esculenta* tienen espectros de UV que incluyen un pico de absorción resultante de la contaminación por florotanino.

15 La presencia de florotanino en una muestra de glucano puede influir en las propiedades biológicas del glucano. Por consiguiente, puede resultar deseable eliminar de la muestra el florotanino, particularmente cuando el glucano es para uso médico o nutricional.

Puede utilizarse cualquier procedimiento adecuado para llevar a cabo la espectroscopia de UV/VIS para medir la 20 contaminación del glucano por florotanino. Por ejemplo, los autores de la invención han descubierto que pueden obtenerse espectros de UV/VIS adecuados utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer LAMBDA™ 25 a presión y temperatura ambiente, utilizando una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm que contiene glucano a 1 mg/ml en agua. El experto en la materia sería capaz de seleccionar otros procedimientos y condiciones adecuados para obtener espectros de UV/VIS.

25 En la técnica se conocen otros procedimientos de medición del florotanino. Por ejemplo, en la referencia 30 se utilizó la cromatografía líquida de alto rendimiento para la detección y cuantificación de florotanino. El experto en la materia sería capaz de seleccionar procedimientos que resulten adecuados para medir la contaminación por florotanino en la presente invención.

30 El florotanino puede separarse del glucano mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, pueden utilizarse procedimientos de filtración. El experto en la materia sería capaz de seleccionar filtros que tengan propiedades adecuadas para la separación del florotanino a partir del glucano. Por lo general, el filtro utilizado para separar el florotanino del glucano es un filtro de profundidad. El experto en la materia conoce bien los filtros de profundidad. Los filtros de profundidad adecuados incluyen filtros Cuno™ SP, que tienen un medio filtrante compuesto por un coadyuvante de filtración inorgánico, celulosa y una resina que proporciona una carga positiva a la matriz del filtro. Por ejemplo, los autores de la invención han descubierto que el filtro Cuno™ 10 SP es 35 particularmente eficaz. Sin embargo, también pueden utilizarse otros filtros de profundidad y otros procedimientos de filtración. Por ejemplo, puede utilizarse la filtración en gel. También pueden ser adecuados los filtros de carbono. El experto en la materia conoce bien los filtros de carbono. Comprenden, por lo general, un lecho de carbón activado granulado suelto o un bloque de carbón activado prensado o extruido, que actúa como filtro para la purificación de una muestra. Como alternativa, pueden utilizarse procedimientos cromatográficos para separar el florotanino del glucano. Por ejemplo, puede utilizarse la cromatografía de afinidad con resina, en la que el florotanino o el glucano 40 queda retenido en la resina.

45 La separación del florotanino a partir del glucano puede llevarse a cabo en una (o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) o más subetapas. Por ejemplo, los autores de la invención han descubierto que resultan particularmente eficaces tres subetapas de filtración utilizando un filtro de profundidad (por ejemplo, un filtro Cuno™ 10 SP) para reducir la contaminación por florotanino.

El experto en la materia es capaz de identificar otras técnicas y condiciones de separación que den como resultado la reducción necesaria de la contaminación por florotanino. Por ejemplo, las técnicas y condiciones de separación pueden optimizarse llevando a cabo una etapa de separación de ensayo y a continuación midiendo la contaminación por florotanino residual mediante los procedimientos descritos anteriormente.

## 50 **Conjugados**

Los β-glucanos puros son malos inmunógenos. Por lo tanto, para una eficacia protectora, los β-glucanos utilizados con la invención se conjugan preferentemente con una proteína transportadora. Se conoce bien el uso de la conjugación con proteínas transportadoras con el fin de potenciar la inmunogenicidad de los antígenos glucídicos [por ejemplo, revisado en las ref. 31 a 39, etc.] y se utiliza en particular para las vacunas pediátricas [40].

55 La invención proporciona una composición que comprende: (a) una composición inmunógena, tal como se ha definido anteriormente y (b) un adyuvante, tal como se ha definido anteriormente.

La molécula transportadora puede conjugarse covalentemente con el glucano directamente o a través de un conector. Puede utilizarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado cuando sea necesario.

- 5 La fijación del antígeno glucano al transportador se realiza preferentemente a través de un grupo -NH<sub>2</sub>, por ejemplo en la cadena lateral de un residuo de lisina en una proteína transportadora, o de un residuo de arginina. Cuando un glucano tiene un grupo aldehído libre, este puede reaccionar con una amina en el transportador para formar un conjugado por aminación reductora. La fijación al transportador también puede ser a través de un grupo -SH, por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de cisteína. Como alternativa, el antígeno glucano puede fijarse al transportador a través de una molécula conectora.
- 10 Por lo general, el glucano será activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [41, 42, etc.]). Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU (véase también la introducción de la referencia 43).
- 15 Los enlaces directos con la proteína pueden comprender oxidación del glucano seguida de aminación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 44 y 45.
- 20 Pueden generarse enlaces a través de un grupo conector utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 46 y 47. Por lo general, el conector se fija a través del carbono anomérico del glucano. Un tipo preferente de enlace es un conector de ácido adípico, que puede formarse acoplando un grupo -NH<sub>2</sub> libre (por ejemplo, introducido en un glucano por aminación) con ácido adípico (utilizando, por ejemplo, la activación con diimida), y a continuación acoplando una proteína al producto intermedio sacárido-ácido adípico resultante [35, 48, 49]. Un tipo preferente similar de enlace es un conector de ácido glutárico, que puede formarse acoplando un grupo NH<sub>2</sub> libre con ácido glutárico de la misma manera. También pueden formarse conectores de ácido glutárico y adípico por acoplamiento directo al glucano, es decir, sin la introducción previa de un grupo libre, por ejemplo, un grupo -NH<sub>2</sub> libre, al glucano, seguido de acoplamiento de una proteína al producto intermedio sacárido-ácido glutárico/adípico resultante. Otro tipo preferente de enlace es un conector carbonilo, que puede formarse por reacción de un grupo hidroxilo libre de un glucano modificado con CDI [50, 51] seguida de reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otros conectores incluyen β-propionamido [52], nitrofeniletilamina [53], haluros de haloacilo [54], enlaces glicosídicos [55], ácido 6-aminocaproico [56], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [57], dihidrazida del ácido adípico ADH [58], restos C4 a C12 [59], etc. También puede utilizarse la condensación con carbodiimida [60].
- 25 30 35 Puede utilizarse un conector bifuncional para proporcionar un primer grupo para el acoplamiento a un grupo amina en el glucano (por ejemplo, introducido en el glucano por aminación) y un segundo grupo para el acoplamiento al transportador (por lo general, para el acoplamiento a una amina en el transportador). Como alternativa, el primer grupo es capaz acoplarse directamente al glucano, es decir, sin la introducción previa de un grupo, por ejemplo, un grupo amina, al glucano.
- 40 En algunas formas de realización, el primer grupo en el conector bifuncional es, por lo tanto, capaz de reaccionar con un grupo amina (-NH<sub>2</sub>) en el glucano. Esta reacción implicará por lo general una sustitución electrófila del hidrógeno de la amina. En otras formas de realización, el primer grupo en el conector bifuncional es capaz de reaccionar directamente con el glucano. En ambos conjuntos de formas de realización, el segundo grupo en el conector bifuncional es capaz por lo general de reaccionar con un grupo amina en el transportador. Esta reacción implicará de nuevo, por lo general, una sustitución electrófila de la amina.
- 45 50 55 Cuando las reacciones con el glucano y con el transportador implican aminas, resulta preferente utilizar un conector bifuncional. Por ejemplo, puede utilizarse un conector homobifuncional de fórmula X-L-X, donde: los dos grupos X son iguales entre sí y pueden reaccionar con las aminas; y donde L es un resto de unión en el conector. Asimismo, puede utilizarse un conector heterobifuncional de fórmula X-L-X, donde: los dos grupos X son diferentes y pueden reaccionar con las aminas; y donde L es un resto de unión en el conector. Un grupo X preferente es N-oxisuccinimida. L tiene preferentemente la fórmula L'-L<sup>2</sup>-L', donde L' es carbonilo. Los grupos L<sup>2</sup> preferentes son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>) por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>.
- 50 55 Asimismo, cuando la reacción con el glucano implica el acoplamiento directo y la reacción con el transportador implica una amina, también resulta preferente utilizar un conector bifuncional. Por ejemplo, puede utilizarse un conector homobifuncional de fórmula X-L-X, donde: los dos grupos X son iguales entre sí y pueden reaccionar con el glucano/amina; y donde L es un resto de unión en el conector. Asimismo, puede utilizarse un conector heterobifuncional de fórmula X-L-X, donde: los dos grupos X son diferentes y uno puede reaccionar con el glucano, mientras que el otro puede reaccionar con la amina; y donde L es un resto de unión en el conector. Un grupo X preferente es N-oxisuccinimida. L tiene preferentemente la fórmula L'-L<sup>2</sup>-L', donde L' es carbonilo. Los grupos L<sup>2</sup> preferentes son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>) por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>.

Otros grupos X para su uso en los conectores bifuncionales descritos en los dos párrafos anteriores son los que forman ésteres cuando se combinan con HO-L-OH, tales como norborano, ácido p-nitrobenzoico y sulfo-N-hidroxisuccinimida.

5 Conectores bifuncionales adicionales para su uso con la invención incluyen haluros de acriloilo (por ejemplo, cloruro) y haloacil haluros.

El conector se añadirá, generalmente, en exceso molar con respecto al glucano durante el acoplamiento al glucano.

Las proteínas transportadoras son toxinas bacterianas, tales como las toxinas diftérica o tetánica, o toxoides o mutantes de los mismos. Estas se utilizan comúnmente en las vacunas conjugadas. Resulta particularmente preferente el mutante de toxina diftérica CRM<sub>197</sub> [61].

10 Las proteínas transportadoras incluyen el complejo proteico de membrana externa de *N. meningitidis* [62], péptidos sintéticos [63,64], proteínas de choque térmico [65,66], proteínas de pertussis [67,68], citocinas [69], linfocinas [69], hormonas [69], factores de crecimiento [69], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T CD4+ humanos de抗ígenos derivados de diversos patógenos [70], tales como N19 [71], la proteína D de *H. influenzae* [72-74], neumolisina [75] o sus derivados no tóxicos [76], la proteína de superficie neumocócica PspA [77], proteínas de captación de hierro [78], toxina A o B de *C. difficile* [79], exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [80], etc. Es posible utilizar mezclas de proteínas transportadoras. Una sola proteína transportadora puede transportar múltiples glucanos diferentes [81].

20 Los conjugados pueden tener exceso de transportador (p/p) o exceso de glucano (p/p) por ejemplo, en el intervalo de relaciones de 1:5 a 5:1. Los conjugados con exceso de proteína transportadora se encuentran, por lo general, por ejemplo en el intervalo de 0,2:1 a 0,9:1, o pesos iguales. El conjugado puede incluir pequeñas cantidades de transportador libre (es decir, no conjugado). Cuando una proteína transportadora determinada está presente en forma libre y en forma conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferentemente no más del 5 % de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición en su totalidad, y más preferentemente está presente en menos del 2 % (en peso).

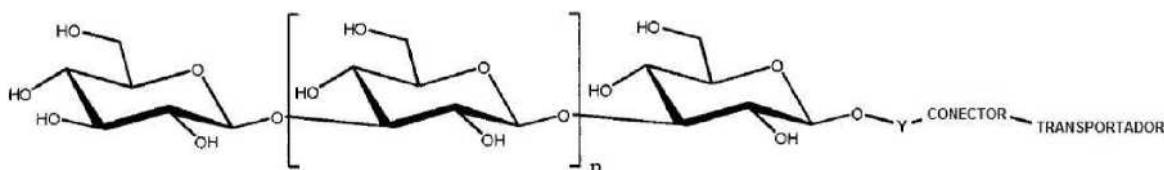
25 Cuando el conjugado forma el componente glucano en una composición inmunógena de la invención, la composición también puede comprender proteína transportadora libre como inmunógeno [82].

Después de la conjugación, pueden separarse los glucanos libres y conjugados. Existen muchos procedimientos adecuados, por ejemplo, cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las referencias 83, 84, etc.]. Resulta preferente la ultrafiltración de flujo tangencial.

30 El resto de glucano en el conjugado es preferentemente un glucano de bajo peso molecular, como se ha definido anteriormente. Por lo general, se ajustará el tamaño de los oligosacáridos antes de la conjugación.

El conjugado de proteína-glucano es preferentemente soluble en agua y/o en un tampón fisiológico.

35 Los autores de la invención han descubierto que puede mejorarse la inmunogenicidad si hay un espaciador entre el glucano y la proteína transportadora. En este contexto, un "espaciador" es un resto que es más largo que un solo enlace covalente. Este espaciador puede ser un conector, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, puede ser un resto enlazado covalentemente entre el glucano y un conector. Por lo general, el resto se enlazará covalentemente al glucano antes del acoplamiento al conector o transportador. Por ejemplo, el espaciador puede ser un resto Y, donde Y comprende un alquilo de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>), por lo general de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>). Los 40 autores de la invención han descubierto que resulta particularmente adecuado un alquilo de cadena lineal con 6 átomos de carbono (es decir, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>), y que puede proporcionar una mayor inmunogenicidad que las cadenas más cortas (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>). Por lo general, Y está fijado al carbono anomérico del glucano, normalmente a través de un enlace -O-. Sin embargo, Y puede estar unido a otras partes del glucano y/o a través de otros enlaces. El otro extremo de Y está enlazado al conector mediante cualquier enlace adecuado. Por lo general, Y termina con un grupo amina para facilitar la unión a un conector bifuncional, como se ha descrito anteriormente. En estas formas de realización, Y está enlazado, por lo tanto, al conector mediante un enlace -NH-. Por consiguiente, se prevé específicamente para su uso en la presente invención un conjugado con la siguiente estructura:



50 en la que n+2 se encuentra en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 2-40. Preferentemente, n+2 se encuentra en el intervalo de 25-30 o 11-19, por ejemplo, 13-17. Los autores de la invención han descubierto que

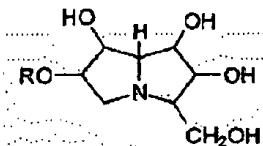
resulta adecuado un  $n+2 = 15$ . Y es como se ha descrito anteriormente. "CONECTOR" es un conector opcional como se ha descrito anteriormente, mientras que "TRANSPORTADOR" es una molécula transportadora tal como se ha descrito anteriormente.

### **Adyuvantes**

- 5 Aunque se han descrito los  $\beta$ -glucanos por sí mismos como adyuvantes, una composición inmunógena puede incluir un adyuvante distinto, que puede actuar para potenciar las respuestas inmunitarias (humoral y/o celular) inducidas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes que pueden utilizarse con la invención incluyen, pero no se limitan a:
- Una composición que contiene minerales, incluidas sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato cálcico (por ejemplo, las partículas "CAP" descritas en la ref. 85). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., adoptando las sales cualquier forma adecuada (por ejemplo, de gel, cristalina, amorfa, etc.). Resulta preferente la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [86]. Pueden utilizarse los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se utilizan sólo por comodidad, ya que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 170). En la invención puede utilizarse cualquiera de los adyuvantes "hidróxido" o "fosfato" que son de uso general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son por lo general sales de oxihidróxido de aluminio, que suelen ser al menos parcialmente cristalinas. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son por lo general hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Pueden obtenerse por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución del hidroxilo por fosfato en la sal. La invención puede utilizar una mezcla de un hidróxido de aluminio y de un fosfato de aluminio. En este caso, puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1, por ejemplo,  $\geq 5:1$ ,  $\geq 6:1$ ,  $\geq 7:1$ ,  $\geq 8:1$ ,  $\geq 9:1$ , etc. La concentración de  $Al^{+++}$  en una composición para su administración a un paciente es preferentemente inferior a 10 mg/ml, por ejemplo,  $\leq 5$  mg/ml,  $\leq 4$  mg/ml,  $\leq 3$  mg/ml,  $\leq 2$  mg/ml,  $\leq 1$  mg/ml, etc. Un intervalo preferente es entre 0,3 mg/ml y 1 mg/ml. Resulta preferente un máximo de 0,85 mg/dosis.
  - Saponinas [capítulo 22 de la ref. 170], que son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una gran variedad de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonaria). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como los ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™. Se han purificado composiciones de saponina utilizando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas utilizando estas técnicas, incluidas QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la ref. 87 se describe un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [88]. Pueden utilizarse combinaciones de saponinas y colesteroles para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimuladores (los ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 170]. Los ISCOM incluyen también, por lo general, un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede utilizarse en los ISCOM cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las ref. 88-90. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [91]. En las ref. 92 y 93 puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina.
  - Toxinas bacterianas de ribosilación de ADP (por ejemplo, la enterotoxina termolábil "LT" de *E. coli*, la toxina del cólera "CT" o la toxina de pertussis "PT") y, en particular, derivados detoxificados de las mismas (véase la ref. 3), tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 [94] o CT-E29H [95]. El uso de toxinas de ribosilación de ADP detoxificadas como adyuvantes para administración en las mucosas se describe en la ref. 96 y como adyuvantes parenterales en la ref. 97.
  - Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado [98] o quitosano, y sus derivados [99].
  - Micropartículas (es decir, una partícula de  $\sim 100$  nm a  $\sim 150$   $\mu m$  de diámetro, más preferentemente  $\sim 200$  nm a  $\sim 30$   $\mu m$  de diámetro, o  $\sim 500$  nm a  $\sim 10$   $\mu m$  de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un polí( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), siendo preferente poli(lactida-co-glicólido), tratado opcionalmente para que tenga una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).
  - Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 170). En las ref. 100-102 se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes.

- Peptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida ("DTP-DPP" o "Theramide™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").

- 5 • Un polímero de polioxidonio [103, 104] u otro derivado de polietilen-piperazina N-oxidado.
- Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [105].
- Un compuesto polihidroxilado de pirrolizidina [106], tal como uno con la fórmula:



10 en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo, lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos, saturados o no saturados, o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- $\alpha$ -D-glucopiranosa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

- 15 • Un ligando de CD1d, tal como una  $\alpha$ -glucosilceramida [107-114] (por ejemplo,  $\alpha$ -galactosilceramida),  $\alpha$ -glucosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-( $\alpha$ -D-galactopiranoso)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfogalactosilceramida, etc.

- Una gamma-inulina [115] o un derivado de la misma, tal como algamulina.

20 • Una emulsión de aceite en agua. Se conocen diversas de tales emulsiones, y por lo general incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite(s) y el tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión tienen un diámetro generalmente inferior a 5  $\mu\text{m}$ , e incluso pueden tener un diámetro inferior a la micra, consiguiéndose estos pequeños tamaños con un microfluidificador para proporcionar emulsiones estables. Resultan preferentes las gotitas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

- 25 • Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene un residuo de citosina no metilado unido por un enlace fosfato a un residuo de guanosina), o un motivo Cpl (una secuencia dinucleotídica que contiene citosina unida a inosina), o un ARN bicanario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli(dG). Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicanarios o (a excepción del ARN) monocatenarios. En las referencias 116, 117 y 118 se describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, la sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las ref. 119-124. Una secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [125]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN (oligodesoxinucleótido) CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se analizan en las ref. 126-128. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden fijarse dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 125 y 129-131. Un adyuvante CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otro es CpG1826. Como alternativa al uso, o además del uso, de secuencias CpG, pueden utilizarse secuencias TpG [132], y estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados. El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se describe en la ref. 132) y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de timidina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se describe en la referencia 132), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de citosina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán por lo general al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

30 • Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimuladores se conoce como IC31™ [133]. Por lo tanto, un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un

35 • Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimuladores se conoce como IC31™ [133]. Por lo tanto, un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un

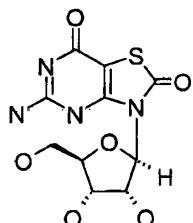
40 • Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimuladores se conoce como IC31™ [133]. Por lo tanto, un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un

45 • Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimuladores se conoce como IC31™ [133]. Por lo tanto, un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un

50 • Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimuladores se conoce como IC31™ [133]. Por lo tanto, un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un

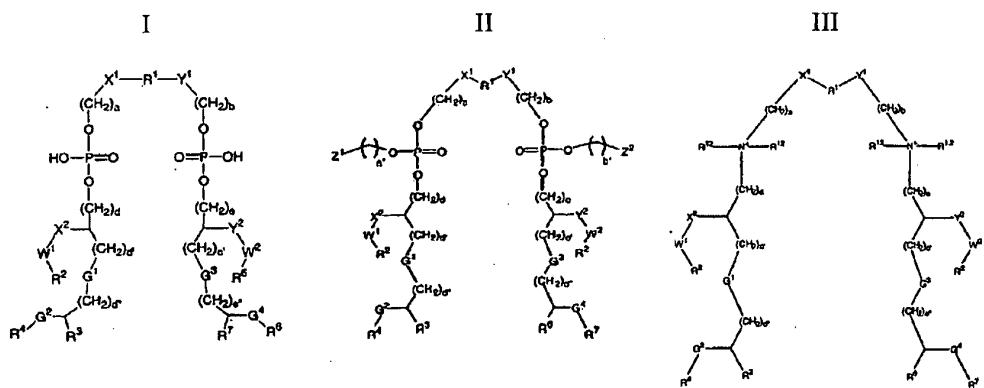
oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) que incluya al menos uno de los motivos (y preferentemente múltiples motivos) Cpl, y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluya al menos una (y preferentemente múltiples) secuencia(s) tripeptídica(s) Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprenda la secuencia 26-mera 5'-(IC)<sub>13</sub>-3' (SEQ ID NO: 1). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos 11-mera KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 2).

- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado ("3dMPL", también conocido como 'MPL™') [134-137]. En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar partículas o agregados micelares con diferentes tamaños, por ejemplo, con un diámetro <150 nm o >500 nm. Cualquiera o ambos de estos pueden utilizarse con la invención y pueden seleccionarse las mejores partículas mediante ensayo rutinario. Resultan preferentes partículas más pequeñas (por ejemplo, lo suficientemente pequeñas como para proporcionar una suspensión acuosa transparente de 3dMPL) para su uso según la invención, debido a su actividad superior [138]. Las partículas preferentes tienen un diámetro medio inferior a 220 nm, más preferentemente inferior a 200 nm o inferior a 150 nm o inferior a 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro medio inferior a 100 nm. Sin embargo, en la mayoría de los casos el diámetro medio no será inferior a 50 nm.
- Un compuesto de imidazoquinolina, tal como Imiquimod ("R-837") [139, 140], Resiquimod ("R-848") [141] y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de hidrocloruro). Pueden encontrarse más detalles sobre las imidazoquinolinas inmunoestimuladoras en las referencias 142 a 146.
- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los descritos en la referencia 147. En la referencia 147 también se describen procedimientos de formulación, fabricación y cribado de compuestos activos. Las tiosemicarbazonas resultan particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tal como TNF- $\alpha$ .
- Un compuesto de triptantrina, tal como los descritos en la referencia 148. En la referencia 148 también se describen procedimientos de formulación, fabricación y cribado de compuestos activos. Las tiosemicarbazonas resultan particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tal como TNF- $\alpha$ .
- Un análogo de nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):

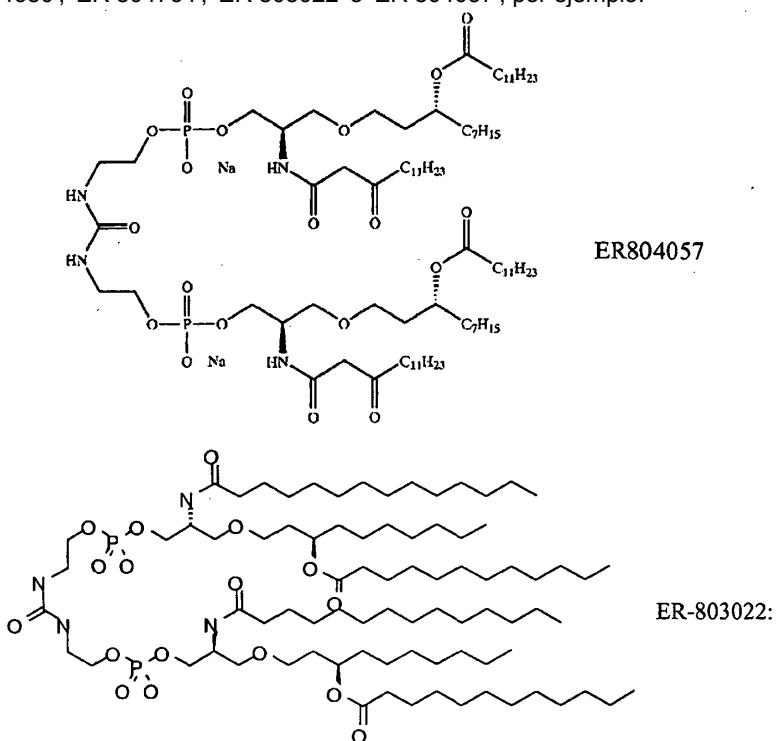


y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos descritos en las referencias 149 a 151. Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [152].

- Los compuestos descritos en la referencia 153, incluidos: compuestos de acilpiperazina, compuestos de Indoldiona, compuestos de Tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de Benzociclodiona, compuestos de Aminoazavinilo, compuestos de Aminobencimidazol quinolinona (ABIQ) [154, 155], compuestos de Hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de Quinazolinona, compuestos de pirrol [156], compuestos de Antraquinona, compuestos de Quinoxalina, compuestos de Triazina, compuestos de Pirazalopirimidina y compuestos de Benzazol [157].
- Un derivado de fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como RC-529 [158159].
- Un fosfaceno, tal como poli[di(carboxilatofenoxy)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 160 y 161.
- Una urea sustituida o compuesto de fórmula I, II o III, o una sal del mismo:

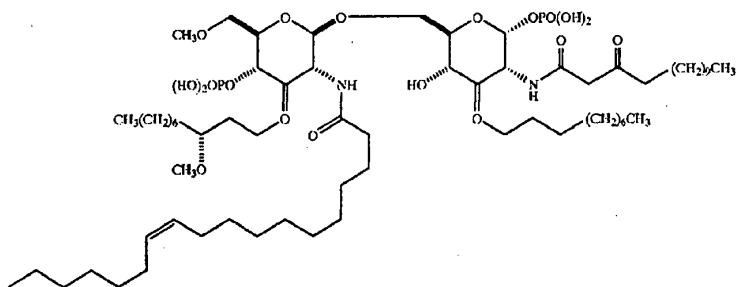


tal como se define en la referencia 162, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022' o 'ER 804057', por ejemplo:



5

- Derivados de lípido A de *Escherichia coli*, tal como OM-174 (descrito en las ref. 163 y 164).
- Compuestos que contienen lípidos unidos a una estructura acíclica que contiene fosfato, tal como el antagonista de TLR4, E5564 [165, 166]:



10

Estas y otras sustancias activas como adyuvante se analizan con mayor detalle en las referencias 170 y 171.

Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente un 5 % de escualeno, aproximadamente un 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente un 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas relaciones se convierten en un 4,3 % de escualeno, un 0,5 % de polisorbato 80 y un 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [167-169], como se describe con mayor detalle en el capítulo 10 de la ref. 170 y en el capítulo 12 de la ref. 171. La emulsión MF59 incluye, ventajosamente, iones citrato, por ejemplo, tampón citrato sódico 10 mM.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de un 2 % a un 10 % de escualeno, de un 2 % a un 10 % de tocoferol y de un 0,3 % a un 3 % de Tween 80, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el Tween 80 pueden estar presentes en una relación de volumen de aproximadamente 5:2. Puede hacerse una de tales emulsiones disolviendo Tween 80 en PBS para proporcionar una solución al 2 %, a continuación mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno) y a continuación microfluidificando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100). La emulsión 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 Triton (por ejemplo Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de  $\alpha$ -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750  $\mu$ g/ml de polisorbato 80, 110  $\mu$ g/ml de Triton X-100 y 100  $\mu$ g/ml de succinato de  $\alpha$ -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes proveniente de los 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 escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para los dipéptidos de muramilo, y se ha utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [172] (Thr-MDP al 0,05 %-1 %, escualano al 5 %, Pluronic L121 al 2,5 % y polisorbato 80 al 0,2 %). También puede utilizarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [173] (escualano al 5 %, Pluronic L121 al 1,25 % y polisorbato 80 al 0,2 %). Resulta preferente la microfluidificación.
- Una emulsión con un 0,5 -50 % de un aceite, 0,1-10 % de un fosfolípido y 0,05-5 % de un agente tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 174, los componentes fosfolípidicos preferentes son fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilsérina, fosfatidilinositol, fosfatidiglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Resultan ventajosos los tamaños de gotita submicrométricos.
- Una emulsión submicrométrica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 175, producido por adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2- hidroxietil)propanodiamina.
- Una emulsión en la cual se asocian una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo, un colesterol) como micelas helicoidales [176].

Los adyuvantes de emulsión preferentes tienen un tamaño medio de gotita de < 1  $\mu$ m, por ejemplo, ≤750 nm, <500 nm, ≤400 nm, ≤300 nm, ≤250 nm, ≤220 nm, ≤200 nm, o menores. Estos tamaños de gotita pueden conseguirse de manera práctica mediante técnicas tales como la microfluidificación.

En algunas formas de realización, y particularmente cuando el  $\beta$ -glucano es del tipo laminaria, preferentemente una composición no está adyuvada con adyuvante completo de Freund ni con una toxina del cólera de tipo silvestre.

Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán por lo general en mezcla.

Cuando se utiliza como adyuvante una sal de aluminio para un conjugado, resulta preferente que al menos un 50 % en masa del conjugado en una composición esté adsorbido a la sal, por ejemplo, > 60 %, > 70 %, > 80 %, > 90 %, > 95 %, > 98 %, > 99 % o el 100 %. Puede conseguirse fácilmente una adsorción de > 99 % con una sal de hidróxido.

Las composiciones pueden incluir dos o más de dichos adyuvantes. Como se muestra en los ejemplos, tales combinaciones pueden mejorar la respuesta inmunitaria producida por los conjugados de glucano. Los adyuvantes individuales pueden inducir de manera preferente una respuesta Th1 o una respuesta Th2, y las combinaciones útiles de adyuvantes pueden incluir un adyuvante Th2 (por ejemplo, una emulsión de aceite en agua o una sal de

aluminio) y un adyuvante Th1 (por ejemplo, 3dMPL, una saponina o un oligonucleótido inmunoestimulador). Por ejemplo, las composiciones pueden comprender ventajosamente: una sal de aluminio y un oligodesoxinucleótido inmunoestimulador; una sal de aluminio y un compuesto de fórmula I, II o III; una emulsión de aceite en agua y un compuesto de fórmula I, II o III; una emulsión de aceite en agua y un oligodesoxinucleótido inmunoestimulador; una sal de aluminio y una  $\alpha$ -glucosilceramida; una emulsión de aceite en agua y una  $\alpha$ -glucosilceramida; una emulsión de aceite en agua y 3dMPL; una emulsión de aceite en agua y una saponina; etc.

### **Composiciones farmacéuticas**

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) una composición inmunógena de la invención, (b) un adyuvante, como se ha descrito anteriormente y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En 10 la referencia 177 se dispone de un análisis detallado de tales vehículos.

Las infecciones microbianas afectan a diversas áreas del cuerpo y por lo tanto las composiciones de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse en forma de inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La composición puede prepararse para la administración tópica, por ejemplo, como un ungüento, crema o polvo. La composición se prepara para la administración oral, por ejemplo, en forma de comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo como un inhalador, utilizando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un suppositorio o pesario. La composición puede prepararse para la administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo como gotas, como un aerosol o como un polvo [por ejemplo, 178].

La composición farmacéutica es preferentemente estéril. Preferentemente, es apirógena.

Preferentemente, está tamponada, por ejemplo a entre pH 6 y pH 8, generalmente a alrededor pH 7. La composición puede ser acuosa, o puede estar liofilizada. Los autores de la invención han descubierto que las formulaciones líquidas de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser inestables (Figuras 17 y 18). Por consiguiente, pueden resultar preferentes las formulaciones liofilizadas. Por otra parte, los autores de la invención también han descubierto que los adyuvantes de emulsión de aceite en agua, y, en particular, MF59, pueden mejorar la estabilidad de las formulaciones líquidas de las composiciones farmacéuticas (Figuras 17 y 18). Por consiguiente, cuando las composiciones farmacéuticas se preparan como formulaciones líquidas, puede resultar preferente que el adyuvante incluya una emulsión de aceite en agua.

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

Las composiciones farmacéuticas de la invención son composiciones inmunógenas, al comprender una cantidad inmunitariamente eficaz de un inmunógeno de glucano. Se entiende por "cantidad inmunitariamente eficaz" que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación por parte del médico tratante de la situación médica, y otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad esté incluida en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de experimentos rutinarios.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos.

45 Las composiciones inmunógenas de la invención pueden utilizarse terapéuticamente (es decir, para tratar una infección existente) o profilácticamente (es decir, para prevenir la infección en el futuro). La inmunización terapéutica resulta particularmente útil para el tratamiento de la infección por *Candida* en sujetos inmunocomprometidos.

### **Tratamientos médicos y usos**

50 La invención también proporciona una composición inmunógena de la invención, para su uso en medicina, por ejemplo para provocar una respuesta de anticuerpos en un mamífero. La invención también proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica o composición inmunógena de la invención.

La invención también proporciona el uso de (i) una composición inmunógena de la invención y (ii) un adyuvante, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una infección microbiana en un mamífero.

55 La respuesta inmunitaria provocada mediante estos procedimientos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos después de la inmunización con sacáridos son bien conocidos en la técnica. La respuesta

de anticuerpos es preferentemente una respuesta de IgA o IgG. La respuesta inmunitaria puede ser profiláctica y/o terapéutica. El mamífero es preferentemente un ser humano. Dado que los glucanos (y en particular los  $\beta$ -glucanos) son un componente polisacárido esencial y principal de casi todos los hongos patógenos, particularmente los implicados en infecciones en sujetos inmunocomprometidos, y también en los patógenos bacterianos y protozoos, la inmunidad anti-glucano puede tener eficacia contra una gran variedad de patógenos y enfermedades. Por ejemplo, el suero anti-glucano generado tras la inmunización con *S. cerevisiae* presenta reacción cruzada con *C. albicans*. La inmunidad de amplio espectro resulta particularmente útil porque, para estos agentes fúngicos infecciosos para humanos, la quimioterapia es escasa, está apareciendo resistencia a los antifúngicos y se reconoce cada vez más la necesidad de vacunas preventivas y terapéuticas.

5 Los usos y procedimientos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento/la protección contra las infecciones de: especies de *Candida*, tal como *C. albicans*; especies de *Cryptococcus*, tal como *C. neoformans*; especies de *Enterococcus*, tal como *E. faecalis*; especies de *Streptococcus*, tales como *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. agalactiae* y *S. pyogenes*; especies de *Leishmania*, tal como *L. major*; especies de *Acanthamoeba*, tal como *A. castellani*; especies de *Aspergillus*, tales como *A. fumigatus* y *A. flavus*; especies de *Pneumocystis*, tal como *P. carinii*; especies de *Mycobacterium*, tal como *M. tuberculosis*; especies de *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*; especies de *Staphylococcus*, tal como *S. aureus*; especies de *Salmonella*, tal como *S. typhimurium*; especies de *Coccidioides* tal como *C. immitis*; especies de *Trichophyton* tal como *T. verrucosum*; especies de *Blastomycetes* tal como *B. dermatidis*; especies de *Histoplasma* tal como *H. capsulatum*; especies de *Paracoccidioides* tal como *P. brasiliensis*; especies de *Pythium*, tal como *P. insidiosum* y especies de *Escherichia*, tal como *E. coli*.

10 Los usos y procedimientos son particularmente útiles para la prevención/tratamiento de enfermedades, incluidas, pero no limitadas a: candidiasis (incluidas candidiasis hepatoesplénica, candidiasis invasiva, candidiasis mucocutánea crónica y candidiasis diseminada); candidemia; aspergilosis, criptococosis, dermatomicosis, esporotricosis y otras micoses subcutáneas, blastomicosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, neumocistosis, muguet, tuberculosis, micobacteriosis, infecciones respiratorias, escarlatina, 15 neumonía, impétigo, fiebre reumática, sepsis, septicemia, leishmaniasis cutánea y visceral, acantamebiasis corneal, fibrosis quística, fiebre tifoidea, gastroenteritis y síndrome hemolítico urémico. La actividad anti *C. albicans* resulta particularmente útil para tratar infecciones en pacientes con SIDA.

20 Puede ensayarse la eficacia de inmunización controlando las respuestas inmunitarias contra el  $\beta$ -glucano (por ejemplo, anticuerpos anti- $\beta$ -glucano) después de la administración de la composición. La eficacia del tratamiento terapéutico puede ensayarse controlando la infección microbiana después de la administración de la composición de la invención.

25 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede llevarse a cabo mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular o al espacio intersticial de un tejido) o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intradérmica, ocular, nasal, ótica o pulmonar. Resulta preferente la inyección o la administración intranasal. Resultan particularmente preferentes la administración subcutánea o intraperitoneal. También resulta preferente la administración intramuscular.

30 La invención puede utilizarse para inducir inmunidad sistémica y/o mucosa.

35 Las vacunas preparadas según la invención pueden utilizarse para tratar tanto a niños como a adultos. Por lo tanto, un sujeto puede tener menos de 1 año de edad, tener 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años o al menos 55 años. Los sujetos preferentes para recibir las vacunas son las personas mayores (por ejemplo,  $\geq 50$  años,  $\geq 60$  años y preferentemente  $\geq 65$  años) o los jóvenes (por ejemplo,  $\leq 5$  años). Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos y en una población pueden utilizarse de forma más general.

40 El tratamiento puede ser mediante un régimen monodosis o un régimen multidosis. En un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo pueden utilizarse dosis múltiples. En un régimen multidosis las diversas dosis pueden proporcionarse por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo una sensibilización parenteral y refuerzo por vía mucosa, una sensibilización por vía mucosa y refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (por lo general dos dosis) resulta particularmente útil en pacientes que no han desarrollado anticuerpos. Las dosis múltiples se administrarán por lo general con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, 45 aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). Cuando se utiliza un régimen multidosis, al menos una dosis incluirá un glucano con adyuvante, pero otra dosis (por lo general una dosis posterior) puede incluir un glucano sin adyuvante. Asimismo, al menos una dosis puede incluir un glucano conjugado, pero otra dosis (por lo general posterior) puede incluir un glucano no conjugado.

50 Los conjugados de la invención pueden combinarse con antígenos no-glucano en una única composición para la inmunización simultánea frente a múltiples patógenos. Como alternativa a la preparación de una vacuna combinada, los conjugados pueden administrarse a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que otras vacunas (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud o a un centro de vacunación). Los

antígenos para su uso en estas vacunas de combinación o para la administración conjunta incluyen, por ejemplo, inmunógenos de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y/o *Pseudomonas aeruginosa*.

Las composiciones de la invención pueden utilizarse junto con antifúngicos, en particular cuando un paciente ya está infectado. El antifúngico ofrece un efecto terapéutico inmediato mientras que la composición inmunógena ofrece un efecto más duradero. Los antifúngicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, azoles (por ejemplo, fluconazol, itraconazol), polienos (por ejemplo, anfotericina B), flucitosina e inhibidores de la escualeno epoxidasa (por ejemplo, terbinafina) [véase también la referencia 179]. El antifúngico y la composición inmunógena pueden administrarse por separado o en combinación. Cuando se administran por separado, se administran por lo general con 7 días de diferencia. Después de la primera administración de una composición inmunógena, el antifúngico puede administrarse más de una vez.

#### **Definiciones**

La expresión "que comprende" abarca "que incluye", "incluido/a", 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.

15 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente", con relación a un valor numérico x, significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

20 A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por lo tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando haya tres componentes, pueden combinarse dos componentes entre sí y a continuación puede combinarse la combinación con el tercer componente, etc.

25 Cuando en el cultivo de células se utilizan materiales de animales (y particularmente de bovino), deben obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En conjunto, resulta preferente cultivar células en ausencia total de materiales provenientes de animales.

Cuando un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición, ese compuesto puede sustituirse, como alternativa, por un profármaco adecuado.

#### **Modos de llevar a cabo la invención**

##### **30 Conjugación de curdlan (1)**

Se trató curdlan con un PM inicial de > 100 kDa mediante hidrólisis ácida utilizando HCl (0,5 M) en DMSO durante 10 minutos a 85 °C. El hidrolizado tenía un DP de alrededor de 25 unidades.

35 Se neutralizó el material hidrolizado con tampón fosfato sódico (400 mM, pH 6,8) y se diluyó con agua para proporcionar una dilución 10:1 del material de partida. La concentración final fue de 1 mg/ml. Después de la dilución, pudo detectarse cierta precipitación. Los precipitados son probablemente un sacárido de alto PM.

Se añadió acetato de amonio y, a continuación, cianoborohidruro sódico. Después de ajustar el pH a 7,0, se incubó la mezcla a 37 °C durante 3-5 días. Este tratamiento introdujo un grupo amino primario en el extremo reductor de los fragmentos de curdlan. A continuación, se purificaron los aminosacáridos por ultrafiltración con una membrana con un tamaño de poro de 3 kDa. Se estimaron los grupos amino mediante el método de Habeeb.

40 Se solubilizó el amino-oligosacárido secado en agua destilada a una concentración del grupo amino de 40 mM, a continuación se añadieron 9 volúmenes de DMSO seguidos de trietilamina a una concentración final de 200 mM. A la solución resultante, se añadió diéster N-hidroxisuccinimídico del ácido adípico para una concentración final de 480 mM. Se estimaron los grupos éster generados de esta manera mediante el análisis de los grupos N-hidroxisuccinimido liberados.

45 Se añadió oligosacárido activado secado a CRM<sub>197</sub> en tampón fosfato 10 mM a pH 7,0. Se mantuvo la reacción en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. El material final tenía una relación de aproximadamente 50:1 en términos de moles de éster N-hidroxisuccinimídico por mol de proteína.

50 A continuación, se purificó el conjugado por ultrafiltración con una membrana con un tamaño de poro de 30 kDa. Se caracterizó el conjugado mediante SDS-Page, SEC-HPLC y RMN. Además, se estimó el contenido de proteína y sacárido (sacárido total y no conjugado).

Se llevó a cabo un trabajo similar utilizando toxoide tetánico como transportador en lugar de CRM197.

Para cinco lotes preparados de conjugados, las relaciones sacárido:proteína fueron las siguientes (exceso de transportador):

Lote	1	2	3	4	5
Transportador	CRM197	CRM197	CRM197	CRM197	Tt
Relación	0,46:1	0,25:1	0,45:1	0,35:1	0,29:1

La Figura 1 muestra un SDS-PAGE de los conjugados de ejemplo, y la Figura 2 muestra sus perfiles de SEC-HPLC.

#### **Conjugación de laminarina y adsorción (2)**

- 5 Se prepararon conjugados de laminarina como se describe en las referencias 2 y 3, utilizando el transportador CRM197. Uno de tales conjugados tenía una relación de masa sacárido:proteína de 0,4:1. Después de la purificación, seguía presente un 0,7 % de glucano libre (no conjugado). La Figura 3 muestra el análisis de HPLC-SEC de la proteína transportadora antes de la conjugación y del conjugado final.
- 10 Los conjugados se prepararon de la misma manera, pero con toxoide tetánico como transportador en lugar de CRM197.

Para otros cinco lotes de conjugados, las relaciones sacárido:proteína fueron las siguientes (exceso de transportador):

Lote	1	2	3	4	5
Transportador	CRM197	CRM197	CRM197	CRM197	Tt
Relación	0,55:1	0,37:1	0,43:1	0,27:1	0,16:1

- 15 Se combinó un conjugado de CRM197 ('CRM-Lam') con una sal de hidróxido de aluminio, a una concentración final de adyuvante de 2 mg/ml. Se incluyó cloruro sódico a 9 mg/ml y fosfato sódico a 10 mM. La composición final tenía un pH de 7,0 e incluía 46,6 µg/ml de glucano, proporcionando así 7 µg/dosis a un volumen de dosis de 150 µl (apto para los estudios con ratones).

- 20 La composición final se analizó mediante SDS-PAGE. Además, para determinar el grado de adsorción, se centrifugó y su sobrenadante se analizó en paralelo. También se utilizó la precipitación con TCA y se analizó de nuevo el sobrenadante. Para la comparación, también se analizó el material no adsorbido, que era CRM197 no conjugado en forma libre y en forma adsorbida. En presencia del adyuvante, no se detectaron bandas en los sobrenadantes de CRM-Lam y/o de CRM no conjugado.

También se evaluó la adsorción analizando los sobrenadantes mediante HPLC-SEC. Se midieron los picos a 214 nm y se calculó el grado de adsorción para CRM-Lam en un 99,7 %.

#### **Conjugación (3)**

- 25 Se prepararon conjugados de curdlan sintético (15-mero) y laminarina (17-mero) según el procedimiento descrito en la Figura 4. En resumen, se solubilizaron los oligosacáridos sintéticos indicados en agua destilada a una concentración de grupos amino de 40 mM. A continuación, se añadieron nueve volúmenes de DMSO, seguido de trietilamina a una concentración final de 200 mM. Para el conjugado 15-mero-C6 β(1-3)-CRM, se añadió glutarato diéster N-hidroxisuccinimídico a una concentración final de 240 mM. Para los conjugados 15-mero-C6 β(1-3)-CRM y 17-mero-C6 β(1-3)-CRM, se añadió diéster N-hidroxisuccinimídico del ácido adípico a una concentración final de 480 mM. A continuación, se purificaron los oligosacáridos activados por precipitación con dioxano al 80 % v/v. Se estimó el número de grupos éster generados en cada reacción midiendo la cantidad de grupos N-hidroxi-succinimido liberados. A continuación, se añadieron oligosacáridos activados y secados a una solución de CRM197 de 30 mg/ml en tampón fosfato 10 mM a pH 7,2. Se mantuvo la reacción en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Los materiales finales tenían una relación de aproximadamente 50:1 en términos de moles de éster N-hidroxisuccinimido por mol de proteína.

A continuación, se caracterizaron los conjugados mediante SDS-Page y SEC-HPLC. El contenido de sacáridos y proteínas se estimó de la siguiente manera:

Muestra	Conc. sac. (mg/ml)	Conc. prot. (mg/ml)	Sac./prot. (% p/p)	Sac./prot. (mol/mol)
15-mero-C6 β(1-3)-CRM	923,1	1695,5	54,4	11,7
15-mero-C2 β(1-3)-CRM	651,7	2071,0	31,5	6,8
17-mero-C2 β(1-3)-CRM	2113,7	4096,0	51,7	9,8

La Figura 5 ilustra un análisis de SDS-PAGE de estos conjugados en un gel de tris-acetato al 7 % (20 µg cargados por pocillo).

#### **Conjugación de laminarina (4)**

Se prepararon lotes adicionales de conjugados de laminarina como se describe en las referencias 2 y 3, salvo porque la concentración del fosfato en el tampón fue o bien a) 10 mM (según las referencias 2 y 3, en lo sucesivo, "lote 9"); b) 25 mM; c) 50 mM o d) 100 mM ("lote 10"). A continuación, se caracterizaron los conjugados mediante SEC-HPLC. Se observó mayor agregación en el lote 9 que en los demás lotes, no habiendo agregación detectable en el lote 10 (Figura 6). Estudio de inmunogenicidad (1)

Para ensayar la inmunogenicidad, se combinaron los conjugados de laminarina preparados como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2) con diversos adyuvantes individuales y combinados, y se ensayaron en ratones. Se sometió a ensayo a ratones CD2F1, de 4-6 semanas de edad, en 12 grupos de 10. Los conjugados se utilizaron a una dosis de sacárido de 7 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, administrados los días 1, 7 y 21. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 21 y 35 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym mediante ELISA [2,3].

Se sensibilizó a los grupos 2 y 3 (día 1) utilizando el conjugado en combinación con adyuvante completo de Freund (CFA), solamente a efectos comparativos. El grupo 1 recibió la laminarina con adyuvante CFA y CRM197, pero estos no estaban conjugados. Se sensibilizó al grupo 4 con laminarina no conjugada más CFA. El grupo 5 recibió CFA en solitario. A continuación, estos cinco grupos recibieron una mezcla de laminarina y CRM197 sin adyuvante (grupo 1), conjugado sin adyuvante (grupo 2), laminarina sin adyuvante (grupos 3 y 4) o PBS (grupo 5), los días 7 y 21.

Los grupos 7-8 y 9-12 recibieron tres dosis idénticas de laminarina conjugada con los siguientes adyuvantes: (a) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (b) el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59; (c) un oligodesoxinucleótido con CpG, CpG1826; (e) una combinación de (a) y (c); (f) una combinación de (b) y (c). Los grupos 6 y 9 recibieron lo mismo que los grupos 7 y 8, respectivamente, pero la laminarina y CRM197 no estaban conjugados.

En la Tabla 1 se informan los anticuerpos anti-glucano (GMT) y el número de ratones que presentaron respuesta (%) el día 35.

*Tabla 1*

Grupo	Día 1	Días 7 y 21	GMT	% de respondedores
1	Lam + CRM + CFA	Lam + CRM	5	20
2	Lam-CRM + CFA	Lam-CRM	276	80
3	Lam-CRM + CFA	Lam	21	40
4	Lam + CFA	Lam	3	10
5	CFA	PBS	2	0
6	Lam + CRM + alumbre		2	0
7	Lam-CRM + alumbre		1034	90
8	Lam-CRM + alumbre + CpG		3700	100
9	Lam + CRM + MF59		2	0
10	Lam-CRM + MF59		731	90
11	Lam-CRM + MF59 + CpG		2616	100
12	Lam-CRM + CpG		670	90

Lam-CRM = laminarina conjugada con CRM197  
Lam + CRM = combinación de laminarina y CRM197, sin conjugación  
Lam = laminarina no conjugada, sin CRM197  
CFA = adyuvante completo de Freund  
PBS = solución salina tamponada con fosfato

Los resultados demuestran que una respuesta inmunitaria óptima requiere la conjugación y la presencia de al menos un adyuvante. Las combinaciones de adyuvantes de Th1 y Th2 dieron buenos resultados.

Se estudiaron con mayor detalle las respuestas de IgG de los ratones de los grupos 2 y 11. En los tres casos, estuvieron presentes las subclases de IgG 1 y 3, pero estuvieron ausentes las subclases 2a y 2b.

#### **Estudio de inmunogenicidad (2)**

En un trabajo adicional, se administraron a los ratones los conjugados de curdlan y laminarina preparados como se describe en *Conjugación de curdlan* (1) y *Conjugación de laminarina y adsorción* (2), respectivamente. Se ensayó

más de un lote de conjugados de curdlan.

Los experimentos fueron esencialmente los mismos que en el primer estudio, pero los conjugados se utilizaron a una dosis de sacárido de 5 µg. Los conjugados se administraron sin adyuvante o con los siguientes adyuvantes: (a) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (b) el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59; (c) una combinación de (a) con 10 µg de un oligodesoxinucleótido con CpG, CpG1826; (e) una combinación de (b) con un oligodesoxinucleótido con CpG.

5

En la Tabla 2 se informan los anticuerpos anti-glucano (GMT) y el número de ratones que presentaron respuesta (%) el día 35.

Tabla 2

Grupo	Glucano	Adyuvante	GMT	% de respondedores
1	Laminaria	-	13	57
2		Alumbre	55	80
3		Alumbre + CpG	405	100
4		MF59	26	70
5		MF59 + CpG	282	90
6		-	4	20
7		-	6	25
8		Alumbre	318	90
9	Curdlan	Alumbre + CpG	458	90
10		MF59	322	90
11		MF59 + CpG	148	90
12		-	3	10
13				
14				
15				
16				
17				
18				

10 Aunque los adyuvantes individuales fueron capaces de aumentar la GMT y la proporción de respondedores, para la laminarina y el curdlan las combinaciones de adyuvantes fueron particularmente eficaces. Las combinaciones de adyuvantes de Th1 y Th2 proporcionaron buenos resultados.

Las respuestas de IgG en todos los grupos fueron, como se ha observado anteriormente, principalmente de las subclases 1 y 3.

15

### Estudio de inmunogenicidad (3)

En experimentos adicionales, los conjugados de laminarina y curdlan preparados como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2) y *Conjugación de curdlan* (1), respectivamente, también se adyuvaron con α-galactosilceramida (100 ng) o LT-K63 (2 µg), en solitario o en combinación con otros adyuvantes. También se ensayó el adyuvante CpG a tres dosis diferentes (0,5 µg, 5 µg y 10 µg). Los detalles fueron como en el estudio de inmunogenicidad anterior, pero con 8 ratones por grupo. Los resultados se encuentran en la Tabla 3.

20

Tabla 3

Grupo	Glucano	Adyuvante	GMT	% de respondedores
1	Laminaria	-	2	0
2		Alumbre	15	57
3		LT-K63	10	43
4		MF59	8	25
5		α-GalCer	28	57
6		Alumbre + α-GalCer	384	100
7		MF59 + α-GalCer	176	75
8		Alumbre + CpG <sub>10 µg</sub>	84	75
9		Alumbre + CpG <sub>5 µg</sub>	407	100
10		Alumbre + CpG <sub>0,5 µg</sub>	133	71

(continuación)

Grupo	Glucano	Adyuvante	GMT	% de respondedores
11	Curdlan	-	6	38
12		Alumbre	70	75
13		LT-K63	262	86
14		MF59	20	63
15		α-GalCer	783	100
16		Alumbre + α-GalCer	443	100
17		MF59 + α-GalCer	386	100

Una vez más, las combinaciones de adyuvantes proporcionaron los mejores resultados, salvo porque α-GalCer resultó útil por sí mismo para el conjugado de curdlan. Los mejores resultados del adyuvante CpG se consiguieron a la dosis intermedia.

5

#### **Estudio de inmunogenicidad (4)**

Se inmunizaron ratones, en grupos de 16, por vía intraperitoneal (IP) tres veces con conjugados de laminarina con CRM197 (Lam-CRM, preparado como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2) en combinación con diferentes adyuvantes. Los conjugados se utilizaron a una dosis de sacárido de 5 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, administrados los días 1, 14 y 28. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym mediante ELISA. También se midieron los niveles de anticuerpos anti-laminarina sustituyendo GG-Zym por laminarina en el ELISA, como se describe en la referencia 3.

10

Las GMT de IgG contra el glucano de la pared celular de *Candida* el día 35 se muestran en la Figura 7 (niveles de anticuerpos anti-GGZym) y en la Tabla 4 (niveles de anticuerpos anti-laminarina y anti-GGZym).

15

*Tabla 4*

Grupo	Ratones #	Glucano	Adyuvante	Dosis de sacárido	VPA	Vía	GMT vs. GGzym	GMT vs. laminarina
1	16	Laminarina	Alumbre	5 µg	150 µl	IP	1534	4787
2	16	Laminarina	Alumbre + CpG	5 µg	150 µl	IP	3652	11277
3	16	Laminarina	MF59	5 µg	150 µl	IP	2346	6760
4	16	Laminarina	Alta conc. de IC31	5 µg	150 µl	IP	3318	15042
5	16	Laminarina	Baja conc. de IC31	5 µg	150 µl	IP	507	1138
6	16	Laminarina	α-GalCer	5 µg	150 µl	IP	4418	1776
7	16	Laminarina	Alumbre/α-GalCer	5 µg	150 µl	IP	2530	15238
8	16	Laminarina	OMV nz	5 µg	150 µl	IP	1465	1464
9	16	Laminarina	Alumbre + OMV nz	5 µg	150 µl	IP	2603	11465

Los resultados demuestran la inmunogenicidad de la vacuna de glicoconjungado Lam-CRM en varias formulaciones de adyuvantes diferentes.

#### **Estudio de inmunogenicidad (5)**

En un trabajo adicional, se combinaron laminarina o curdlan conjugado con CRM197 o toxoide tetánico, con diversos adyuvantes individuales y combinados, y se administraron a los ratones por vía subcutánea o intraperitoneal. Los conjugados se prepararon como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2) y *Conjugación de curdlan* (1), respectivamente.

20

Se sometió a ensayo a ratones CD2F1, de 4-6 semanas de edad, en 12 grupos de 10. Los conjugados se utilizaron a una dosis de sacárido de 5 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, administrados los días 1, 14 y 28 por vía subcutánea o intraperitoneal. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym mediante ELISA.

25

Los grupos 1-3 recibieron tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 con los siguientes adyuvantes: (a) un adyuvante de hidróxido de aluminio (300 µg); (b) una combinación de (a) y un oligodesoxinucleótido con CpG, CpG1826 (10 µg) y (c) el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 µg), respectivamente. Los grupos 4-6 se trajeron de la misma manera que los grupos 1-3, respectivamente, salvo porque el glucano fue curdlan en lugar de la laminarina. Los grupos 7-9 se trajeron de la misma manera que los grupos 1-3, respectivamente, salvo porque

30

la laminarina se conjugó con toxoide tetánico en lugar de CRM197. Asimismo, los grupos 10-12 se trataron de la misma manera que los grupos 4-6, respectivamente, salvo porque el curdlan se conjugó con toxoide tetánico en lugar de CRM197.

- 5 En la Figura 8 se muestran los anticuerpos anti-glucano (GMT) el día 42 después de la administración intrapertioneal de los conjugados de laminarina a los ratones. Los resultados correspondientes después de la administración subcutánea se muestran en la Figura 9. Los resultados muestran que, en general, se observaba una mejor respuesta cuando los conjugados se administraban por vía subcutánea. Además, en general se obtuvieron mejores resultados utilizando CRM197 como proteína transportadora, en particular cuando los conjugados se administraban por vía subcutánea.
- 10 Asimismo, en la Figura 10 se muestran los anticuerpos anti-glucano (GMT) el día 42 después de la administración intrapertioneal de los conjugados de curdlan. Los resultados correspondientes después de la administración subcutánea se muestran en la Figura 11. Cuando se utilizó CRM197 como proteína transportadora, se observaba una mejor respuesta cuando los conjugados se administraban por vía subcutánea.

#### **Estudio de inmunogenicidad (6)**

- 15 En otro estudio, se administró a los ratones laminarina o curdlan conjugado con CRM197, utilizando diferentes dosis de sacárido. Los conjugados se prepararon como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2) y *Conjugación de curdlan* (1), respectivamente.
- 20 Se sometió a ensayo a ratones CD2F1, de 4-6 semanas de edad, en 12 grupos de 8. Los conjugados se utilizaron a una dosis de sacárido de 10 µg, 5 µg, 1 µg o 0,1 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, administrados los días 1, 14 y 28. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym y anti-laminarina mediante ELISA.

25 El grupo 1 recibió tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 sin adyuvante y una dosis de sacárido de 5 µg. El grupo 2 recibió tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 con un adyuvante de hidróxido de aluminio (300 µg) y una dosis de sacárido de 5 µg. Se había utilizado un tampón fosfato durante la purificación del conjugado administrado a este grupo. Los grupos 3-6 recibieron tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 con un adyuvante de hidróxido de aluminio (300 µg) y una dosis de sacárido de 10 µg, 5 µg, 1 µg o 0,1 µg, respectivamente. Se había utilizado un tampón de histidina durante la purificación de los conjugados administrados a estos grupos, tal como se describe en la referencia 180.

30 Grupos 7-12 se trataron de la misma manera que los grupos 1-6, salvo porque el glucano fue curdlan en lugar de laminarina.

En la Figura 12 se muestran los anticuerpos anti-glucano (GMT) el día 42 después de la administración de los conjugados de laminarina a diversas dosis de sacárido. Los resultados demuestran que se observaba respuesta a todas las dosis, obteniéndose la mejor respuesta con una dosis de sacárido de 5 µg.

35 En la Figura 13 se muestran los anticuerpos anti-glucano (GMT) el día 42 después de la administración de los conjugados de curdlan. Una vez más, los resultados demuestran que se observaba respuesta a todas las dosis de sacárido. Las mejores respuestas se obtuvieron con dosis de sacárido de 10 µg y 5 µg.

40 En la Figura 14 se muestran los anticuerpos anti-glucano (GMT) el día 42 después de la administración de los conjugados de laminarina. Los resultados obtenidos utilizando el ELISA de anticuerpo anti-GGZym se comparan con los del ELISA de anticuerpo anti-laminarina. Los títulos más altos se observaron utilizando el ELISA de anticuerpo anti-laminarina.

#### **Estudio de inmunogenicidad (7)**

- En un trabajo adicional, se combinó laminarina conjugada con CRM197 con diversos adyuvantes individuales y se administró a los ratones por vía intrapertioneal, subcutánea o intramuscular. El conjugado se preparó como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2).
- 45 Se sometió a ensayo a ratones CD2F1, de 4-6 semanas de edad, en 6 grupos de 16. Los conjugados se utilizaron a una dosis de sacárido de 5 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, administrados los días 1, 14 y 28 por vía intrapertioneal, subcutánea o intramuscular. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym y anti-laminarina mediante ELISA.

50 Los grupos 1-2 recibieron tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 mediante administración intrapertioneal con los siguientes adyuvantes: (a) el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 µl) y (b) (4) IC31 a dosis alta (49,5 µl de una muestra que tenía más de 1.000 nmol/ml de oligodesoxinucleótido y 40 nmol/ml de péptido), respectivamente. Los grupos 3-4 se trataron de la misma manera que los grupos 1-2, respectivamente, salvo porque el conjugado se administró por vía subcutánea. Los grupos 5-6 se trataron de la misma manera que los grupos 1-2, respectivamente, salvo porque el conjugado se administró por vía intramuscular.

En la Figura 15 se muestran los anticuerpos anti-glucano (anti-GGZym) (GMT) el día 42 después de la administración de los conjugados de laminarina. Los resultados demuestran que, en general, se observaban mejores respuestas cuando los conjugados se administraban con el adyuvante MF59. Por otra parte, las respuestas observadas cuando los conjugados se administraban con este adyuvante mostraron una menor dependencia del modo de administración: todos los modos de administración ensayados proporcionaron aproximadamente la misma respuesta con este adyuvante. Se obtuvieron resultados similares utilizando el ELISA de anticuerpo anti-laminarina (Figura 16).

5

#### **Estudio de protección pasiva**

En otro estudio, se ensayó la capacidad de los anticuerpos inducidos por la laminarina conjugada con CRM197 combinada con los adyuvantes hidróxido de aluminio, IC31 o MF59, para inhibir el crecimiento de *C. albicans* *in vivo*.  
10 El conjugado se preparó como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2).

Se obtuvieron distintas combinaciones de sueros de los ratones utilizados en los anteriores *Estudio de inmunogenicidad* (1), *Estudio de inmunogenicidad* (4) y *Estudio de inmunogenicidad* (7). Se obtuvo una combinación  
15 de sueros adicional procedente de ratones preinmunes. Antes de su uso, los sueros se inactivaron mediante un tratamiento a 56 °C durante 30 minutos.

Se sometió a ensayo a ratones CD2F1, de 4-6 semanas de edad, en grupos de 4-5. Se administraron a cada ratón 0,5 ml de una combinación de sueros por vía intrapertioneal. Al cabo de dos horas, se infectó a cada ratón con 0,2 ml de un cultivo de *C. albicans* mediante administración intravenosa a través de la vena caudal, de manera que cada ratón recibió  $5 \times 10^5$  UFC. Al cabo de dos días, se sacrificó cada ratón y se le extrajo el riñón izquierdo. Se homogeneizó cada riñón en presencia de 0,5 ml de PBS con Triton X al 0,1 %. Se sembraron en placas diluciones en serie de los homogenados sobre agar de Sabourad y se incubaron durante 48 h a 28 °C.  
20

En las Figuras 17 y 18 se muestra la acumulación de *C. albicans* en los riñones de los ratones tratados con los sueros preinmunización y postinmunización. Pudo observarse una menor acumulación en los grupos de ratones tratados con los sueros postinmunización de los ratones inmunizados con laminarina conjugada con CRM197 combinada con al menos los adyuvantes IC31 o MF59. Por lo tanto, los anticuerpos generados contra la laminarina conjugada con CRM197 combinada con estos adyuvantes son capaces de inducir inmunidad pasiva. Este efecto fue particularmente claro para los anticuerpos generados contra la laminarina conjugada con CRM197 combinada con el adyuvante MF59.  
25

#### **Purificación de laminarina**

30 Se analizó una solución acuosa de 1 mg/ml de una laminarina disponible en el mercado extraída de *Laminaria digitata* (L-9634, Sigma) mediante espectroscopía de UV/VIS. El espectro de UV/VIS se obtuvo utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 25™ a presión y temperatura ambiente, utilizando una cubeta de cuarzo con una longitud de trayectoria de 1,00 cm. Se analizó el mismo material después de una, dos o tres etapas de filtración utilizando un filtro de profundidad (un filtro Cuno™ 10 SP). Los resultados se muestran en la Figura 19.  
35 La contaminación por florotanino (como se indica mediante un pico de absorbancia de UV a ~ 270 nm) se redujo después de cada etapa de filtración.

#### **Análisis de estabilidad**

40 Se comparó la estabilidad de los conjugados de glucano formulados como líquidos con diversos adyuvantes. El conjugado se preparó como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción* (2). Las muestras se almacenaron a 37 °C durante 4 semanas (Figura 20) y a 2-8 °C durante seis meses (Figura 21). Se controló la liberación de glucano midiendo el % de sacárido libre en diversos instantes de tiempo. La determinación de sacárido libre se basa en la separación del glucano libre del conjugado por medio de extracción en fase sólida (SPE, forma sigilada de *solid phase extraction*) seguido de la determinación cuantitativa del glucano total y libre por medio de chromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada. Se ensayaron las siguientes formulaciones:  
45

20 µg/ml de Lam-CRM en tampón de histidina 10 mM a pH 7, NaCl al 0,9 %, 2 mg/ml de Al(OH)<sub>3</sub>, Tween 20 al 0,05 %;

20 µg/ml de Lam-CRM en tampón fosfato 10 mM a pH 7, NaCl al 0,9 %, 2 mg/ml de Al(OH)<sub>3</sub>, Tween 20 al 0,05 %;

50 20 µg/ml de Lam-CRM en MF59; y

20 µg/ml de Lam-CRM en tampón fosfato 10 mM a pH 7, NaCl al 0,9 %.

Los resultados demuestran que los conjugados de glucano combinados con MF59 son más estables que los conjugados de glucano combinados con hidróxido de aluminio (en tampón fosfato o de histidina).

También se midió la estabilidad de una formulación liofilizada de conjugados de glucano. Las muestras se almacenaron a 4, 25 o 37 °C durante un máximo de 3 meses (Figura 22). Se ensayó la siguiente formulación de dosis unitaria:

5 10 µg/ml de Lam-CRM, 3,5 mg de cloruro sódico, 0,092 mg de fosfato sódico monobásico monohidrato, 0,48 mg de fosfato sódico dibásico dihidrato, 7,3 mg de manitol.

#### **Estudio de inmunogenicidad (8)**

En otro estudio, se combinaron los conjugados preparados como se describe en *Conjugación (3)* y laminarina conjugada con CRM197 con diversos adyuvantes individuales y combinados, y se administraron a los ratones por vía intraperitoneal. La laminarina conjugada con CRM197 se preparó como se describe en *Conjugación de laminarina y adsorción (2)*, a excepción de un lote alternativo de laminarina conjugada con CRM197 (lote 11AD), que se preparó sin una etapa de aminación antes de la conjugación.

10 Se sometió a ensayo a ratones CD2F1, de 4-6 semanas de edad, en 11 grupos de 16. Los conjugados se utilizaron a una dosis de sacárido de 5 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, administrados por vía intraperitoneal los días 1, 14 y 28. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-laminarina mediante ELISA.

15 Los grupos 1-3 recibieron tres dosis idénticas de a) conjugado 17-mero-C2 β(1-3)-CRM; b) conjugado 15-mero-C6 β(1-3)-CRM o c) conjugado 15-mero-C2 β(1-3)-CRM, respectivamente, todos ellos sin adyuvante. Los grupos 4-6 recibieron tres dosis idénticas de a) conjugado 17-mero-C2 β(1-3)-CRM; b) conjugado 15-mero-C6 β(1-3)-CRM o c) conjugado 15-mero-C2 β(1-3)-CRM, respectivamente, todos ellos con el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 µl). Los grupos 7-8 recibieron tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 a) sin adyuvante o b) con el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 µl), respectivamente. Los grupos 9-10 recibieron tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 con a) el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 µl) combinado con IC31 a dosis alta (49,5 µl de una muestra que tenía más de 1.000 nmol/ml de oligodesoxinucleótido y 40 nmol/ml de péptido); o b) un adyuvante de hidróxido de aluminio (300 µg), respectivamente. El grupo 11 recibió tres dosis idénticas de una preparación diferente de laminarina conjugada con CRM197 con el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 µl).

20 En la Figura 23 se muestran los anticuerpos anti-laminarina (GMT) el día 42 después de la administración de los conjugados. Los resultados demuestran que los conjugados sintéticos de laminarina y curdlan tienen una inmunogenicidad similar a la de los demás conjugados. Cuando se encuentra presente un adyuvante, puede mejorar la inmunogenicidad utilizando una versión sintética del glucano pertinente (compárese la respuesta observada después de la administración de 17-mero-C2 β(1-3)-CRM/MF59 (barra 4) con la respuesta observada después de la administración de laminarina conjugada con CRM197/MF59 (barras 7 y 11)). La inmunogenicidad de los glucanos sintéticos puede mejorarse utilizando un espaciador más largo entre el glucano y la proteína transportadora (compárese la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C6 β(1-3)-CRM y 15-mero-C6 β(1-3)-CRM/MF59 (barras 2 y 5)) con la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C2 β(1-3)-CRM y 15-mero-C2 β(1-3)-CRM/MF59 (barras 3 y 6)). En ausencia de adyuvante, la inmunogenicidad frente a los glucanos sintéticos puede mejorarse por la ausencia de ramificaciones β-1,6 (compárese la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C2 β(1-3)-CRM (barra 3) con la respuesta observada después de la administración de 17-mero-C2 β(1-3)-CRM (barra 1)). En contraposición, en presencia de adyuvante, puede mejorarse la inmunogenicidad frente a los glucanos sintéticos por la presencia de ramificaciones β-1,6 (compárese la respuesta observada después de la administración de 17-mero-C2 β(1-3)-CRM/MF59 (barra 4) con la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C2 β(1-3)-CRM/MF59 (barra 6)). Para la laminarina conjugada con CRM197, la omisión de una etapa de aminación antes de la conjugación no impidió la inmunogenicidad (compárense las barras 8 y 11).

#### **45 Estudio de protección activa (1)**

En otro estudio, se ensayó la capacidad de los ratones que recibieron glucanos conjugados con CRM197 combinados con adyuvante MF59 para sobrevivir a la provocación con *C. albicans*. Los conjugados se prepararon como se describe en *Conjugación de laminarina (4)* (lotes 9 y 10) y *Conjugación de curdlan (1)*.

50 Se inmunicaron ratones hembra CD2F1 (Harlan), de cuatro semanas de edad, con tres dosis de laminarina o curdlan conjugado con CRM197, consistiendo cada dosis en 10 µg de polisacárido en 0,2 ml de PBS:MF59 (1:1 v/v) por ratón.

El programa de inmunización fue:

- Día 0 - primera dosis por vía subcutánea
- Día 14 - segunda dosis por vía intraperitoneal
- Día 28 - tercera dosis por vía intraperitoneal

- Día 35 - sangrado
- Día 40 - provocación fúngica mediante administración intravenosa de  $5,0 \times 10^5$  (después de la inmunización con el conjugado de laminarina) o  $2,5 \times 10^5$  (después de la inmunización con el conjugado de curdlan) de células de *C. albicans* cepa BP en 0,2 ml de PBS por ratón.

5 Se midieron los criterios de valoración de la protección en términos de mortalidad (mediana del tiempo de supervivencia (MST, forma siglada de *median survival time*) y de la relación entre los ratones provocados muertos/totales).

La Figura 24 muestra la tasa de supervivencia de los ratones tratados con laminarina conjugada con CRM197 combinada con MF59 o CRM197 y MF59 en solitario, antes de la provocación con *C. albicans*. La mayor supervivencia de los ratones tratados con el conjugado también se muestra en términos de MST en la Tabla 5.

10

Tabla 5

Vacuna	MST (días)
CRM197/MF59	10
Lam-CRM197 lote 9/MF59	16
Lam-CRM197 lote 10/MF59	25

La supervivencia fue mayor en los ratones que recibieron el lote 10 que en los ratones que recibieron el lote 9.

15 La Figura 25 muestra la tasa de supervivencia de los ratones tratados con curdlan conjugado con CRM197 combinado con MF59 o MF59 en solitario, antes de la provocación con *C. albicans*. La mayor supervivencia de los ratones tratados con el conjugado también se muestra en términos de MST en la Tabla 6.

10

Tabla 6

Vacuna	MST (días)
MF59	16
Cur-CRM197/MF59	> 52

20 La supervivencia fue mayor en los ratones que recibieron curdlan conjugado con CRM197 que en los ratones que recibieron laminarina conjugada con CRM197.

#### **Estudio de protección activa (2)**

En un estudio similar, se ensayó la capacidad de los ratones que recibieron glucanos sintéticos conjugados con CRM197 combinados con adyuvante MF59 para sobrevivir a la provocación con *C. albicans*. Los conjugados se prepararon como se describe en *Conjugación* (3). En este estudio, la provocación fúngica fue mediante administración intravenosa de  $5,0 \times 10^5$  células.

25 La Figura 26 muestra la tasa de supervivencia de los ratones tratados con 15-mero-C2  $\beta(1-3)$ -CRM combinado con MF59, 17-mero-C2  $\beta(1-3)$ -CRM combinado con MF59 o MF59 en solitario, antes de la provocación con *C. albicans*. La mayor supervivencia de los ratones tratados con el conjugado 15-mero-C2  $\beta(1-3)$ -CRM también se muestra en términos de MST en la Tabla 7.

30

Tabla 7

Vacuna	MST (días)
MF59	11
17mero-C2-CRM197/MF59	10
15mero-C2-CRM197/MF59	24

El tratamiento con 15-mero-C2  $\beta(1-3)$ -CRM dio como resultado un aumento de la supervivencia, mientras que el tratamiento con 17-mero-C2  $\beta(1-3)$ -CRM no parecía tener ningún efecto. Este resultado sugiere que el epítopo responsable de inducir una respuesta de anticuerpos protectora en el glucano comprende al menos cinco residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos sólo mediante enlaces  $\beta-1,3$ . Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que este efecto puede contribuir a la mayor respuesta de anticuerpos protectora observada en los ratones que recibieron curdlan conjugado con CRM197 que en los ratones que recibieron laminarina conjugada con

35

CRM197 en el *Estudio de protección activa* (1). El curdlan conjugado con CRM197 (en el que el glucano comprende residuos con enlaces  $\beta$ -1,3 solamente) puede contener una mayor proporción de epítopos protectores que la laminarina conjugada con CRM197 (en la que el glucano comprende residuos con enlaces  $\beta$ -1,3 y residuos con enlaces  $\beta$ -1,6).

- 5 Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones mientras permanezcan dentro del ámbito de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

### Referencias

- [1] Cassone y Torosantucci (2006) Expert Rev Vaccines 5:859-67.
- [2] WO03/097091
- [3] Torosantucci *et al.* (2005) JExp Med 202:597-606.
- [7] Tokunaka *et al.* (1999) Carbohydr Res 316:161-172.
- [8] Pang *et al.* (2005) Biosci Biotechnol Biochem 69:553-8.
- [9] Read *et al.* (1996) Carbohydr Res. 281:187-201.
- [10] Takeo y Tei (1986) Carbohydr Res. 145:293-306
- [11] Tanaka *et al.* (2003) Tetrahedron Letters 44:3053-3057
- [12] Ning *et al.* (2002) Tetrahedron Letters 43:5545-5549
- [13] Geurtzen *et al.* (1999) Journal of Organic Chemistry 64 (21):7828-7835
- [14] Wu *et al.* (2003) Carbohydr Res. 338:2203-12
- [15] Nicolaou *et al.* (1997) J. Am. Chem. Soc. 119:449-450
- [16] Yamada *et al.* (1999) Tetrahedron Letters 40:4581-4584
- [17] Yamago *et al.* (2001) Org. Lett. 24:3867-3870
- [18] Yuguo *et al.* (2004) Tetrahedron 60: 6345-6351
- [19] Amaya *et al.* (2001) Tetrahedron Letters 42:9191-9194
- [20] Mei *et al.* (2005) Carbohydr Res. 340:2345-2351
- [21] Takeo *et al.* (1993) Carbohydr Res. 245:81-96
- [22] Jamois *et al.* (2005) Glycobiology 15(4):393-407
- [23] Lefever *et al.* (2001) Chem. Eur. J. 7(20):4411-4421
- [24] Huang *et al.* (2005) Carbohydr Res. 340:603-608
- [25] Patente de EE.UU. 5508191.
- [26] MiKyung *et al.* (2003) Biochemical Engineering Journal, 16:163-8.
- [27] Barsanti *et al.* (2001) JAppl Phycol 13:59-65.
- [28] Bardotti *et al.* (2008) Vaccine 26:2284-96
- [30] Koivikko *et al.* (2007) Phytochem Anal. 18(4):326-32.
- [31] Lindberg (1999) Vaccine 17 Supl 2:S28-36
- [32] Buttery y Moxon (2000) JR Coll Physicians Lond 34:163-8
- [33] Ahmad y Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii
- [34] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567
- [35] EP-B-0 477 508
- [36] Patente de EE.UU. 5.306.492
- [37] WO98/42721
- [38] Dick *et al.* en Conjugate Vaccines (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, 48-114
- [39] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego CA (1996)
- [40] Ramsay *et al.* (2001) Lancet 357(9251): 195-6
- [41] Lees *et al.* (1996) Vaccine 14:190-198.
- [42] WO95/08348.
- [43] WO98/42721
- [44] Patente de EE.UU. 4.761.283
- [45] Patente de EE.UU. 4.356.170
- [46] Patente de EE.UU. 4.882.317
- [47] Patente de EE.UU. 4.695.624
- [48] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [49] EP-A-0208375
- [50] Bethell G.S. *et al.*, J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4
- [51] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
- [52] WO00/10599
- [53] Gever *et al.*, Med. Microbiol. Immunol, 165: 171-288 (1979).
- [54] Patente de EE.UU. 4.057.685.
- [55] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [56] Patente de EE.UU. 4.459.286.
- [57] Patente de EE.UU. 5.204.098
- [58] Patente de EE.UU. 4.965.338
- [59] Patente de EE.UU. 4.663.160.
- [60] WO2007/000343.

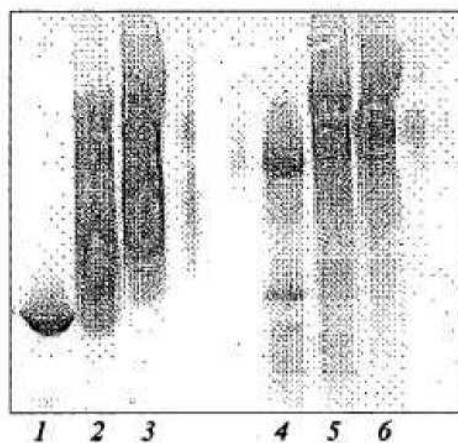
- [61] Research Disclosure, 453077 (enero 2002)
- [62] EP-A-0372501.
- [63] EP-A-0378881.
- [64] EP-A-0427347.
- [65] WO93/17712
- [66] WO94/03208.
- [67] WO98/58668.
- [68] EP-A-0471177.
- [69] WO91/01146
- [70] Falugi *et al.* (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [71] Baraldo *et al.* (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
- [72] EP-A-0594610.
- [73] Ruan *et al.* (1990) J Immunol 145:3379-3384.
- [74] WO00/56360.
- [75] Kuo *et al.* (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [76] Michon *et al.* (1998) Vaccine. 16:1732-41.
- [77] WO02/091998.
- [78] WO01/72337
- [79] WO00/61761.
- [80] WO00/33882
- [81] WO99/42130
- [82] WO96/40242
- [83] Lei *et al.* (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264
- [84] WO00/38711
- [85] Patente de EE.UU. 6355271.
- [86] WO00/23105.
- [87] US 5.057.540.
- [88] WO96/33739.
- [89] EP-A-0109942.
- [90] WO96/11711.
- [91] WO00/07621.
- [92] Barr *et al.* (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [93] Sjolanderet *et al.* (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [94] Pizza *et al.* (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [95] Tebbey *et al.* (2000) Vaccine 18:2723-34.
- [96] WO95/17211.
- [97] WO98/42375.
- [98] Singh *et al.*] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [99] WO99/27960.
- [100] US 6.090.406
- [101] US 5.916.588
- [102] EP-A-0626169.
- [103] Dyakonova *et al.* (2004) Int Immunopharmacol 4(13):1615-23.
- [104] FR-2859633.
- [105] Signorelli y Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.
- [106] WO2004/064715.
- [107] De Libero *et al.*, Nature Reviews Immunology, 2005, 5: 485-496
- [108] Patente de EE.UU. 5.936.076.
- [109] Oki *et al.*, J. Clin. Investig., 113: 1631-1640
- [110] US2005/0192248
- [111] Yang *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43: 3818-3822
- [112] WO2005/102049
- [113] Goff *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126: 13602-13603
- [114] WO03/105769
- [115] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.
- [116] Kandimalla *et al.* (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
- [117] WO02/26757.
- [118] WO99/62923.
- [119] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [120] McCluskie *et al.* (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
- [121] WO98/40100.
- [122] Patente de EE.UU. 6.207.646.
- [123] Patente de EE.UU. 6.239.116.
- [124] Patente de EE.UU. 6.429.199.
- [125] Kandimalla *et al.* (2003) Biochemical Society Transactions 31 (parte 3):654-658.
- [126] Blackwell *et al.* (2003) J Immunol 170:4061-4068.

- [127] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.  
[128] WO01/95935.  
[129] Kandimalla *et al.* (2003) BBRC 306:948-953.  
[130] Bhagat *et al.* (2003) BBRC 300:853-861.  
5 [131] WO03/035836.  
[132] WO01/22972.  
[133] Schellack *et al.* (2006) Vaccine 24:5461-72.  
[134] Myers *et al.* (1990) páginas 145-156 de Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.  
10 [135] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de la referencia 171.  
[136] Johnson *et al.* (1999) J Med Chem 42:4640-9.  
[137] Baldrick *et al.* (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413.  
[138] WO 94/21292.  
[139] US 4.680.338.  
15 [140] US 4.988.815.  
[141] WO92/15582.  
[142] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.  
[143] Wu *et al.* (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83.  
[144] Vasilakos *et al.* (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74.  
20 [145] Patentes de EE.UU. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.  
[146] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.  
25 [147] W02004/060308.  
[148] W02004/064759.  
[149] US 6.924.271.  
[150] US2005/0070556.  
[151] US 5.658.731.  
[152] Patente de EE.UU. 5.011.828.  
30 [153] W02004/87153.  
[154] US 6.605.617.  
[155] WO02/18383.  
[156] W02004/018455.  
[157] WO03/082272.  
[158] Johnson *et al.* (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.  
35 [159] Evans *et al.* (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.  
[160] Andrianov *et al.* (1998) Biomaterials 19:109-115.  
[161] Payne *et al.* (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.  
[162] WO03/011223.  
40 [163] Meraldí *et al.* (2003) Vaccine 21:2485-2491.  
[164] Pajak *et al.* (2003) Vaccine 21:836-842.  
[165] Wong *et al.* (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42.  
[166] US2005/0215517.  
[167] WO90/14837.  
45 [168] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.  
[169] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.  
[170] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).  
[171] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.  
50 [172] Allison y Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.  
[173] Hariharan *et al.* (1995) Cancer Res 55:3486-9.  
[174] WO95/11700.  
[175] Patente de EE.UU. 6.080.725.  
55 [176] W02005/097181.  
[177] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20<sup>a</sup> edición, ISBN: 0683306472.  
[178] Almeida y Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.  
[179] Wills *et al.* (2000) Emerging Therapeutic Targets 4:1-32.  
[180] WO03/009869.

**REIVINDICACIONES**

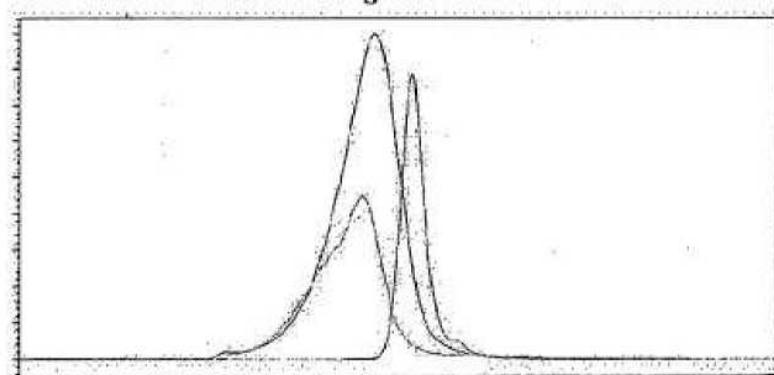
- 5      1. Una composición inmunógena que comprende un glucano que tiene exclusivamente enlaces  $\beta$ -1,3, en la que dicho glucano es una especie molecular única y está conjugado con una proteína transportadora, y en la que el glucano comprende una o más secuencias de al menos cinco residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos sólo mediante enlaces  $\beta$ -1,3, en la que la proteína transportadora es un toxoide o toxina bacteriana, o un mutante de los mismos, preferentemente en la que la proteína transportadora es CRM197
- 10     2. La composición de la reivindicación 1, en la que el glucano está conjugado con la proteína transportadora directamente o a través de un conector.
- 10     3. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que glucano tiene un peso molecular inferior a 100 kDa y/o el glucano tiene 60 o menos unidades de monosacárido glucosa.
- 10     4. La composición de cualquier de reivindicación precedente, en la que el glucano es un curdlan.
- 10     5. La composición de cualquier reivindicación precedente, que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10     6. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición comprende adicionalmente un adyuvante.
- 15     7. La composición de la reivindicación 6, en la que el adyuvante comprende uno o más de: una sal de aluminio; una emulsión de aceite en agua; un oligonucleótido inmunoestimulador y/o una  $\alpha$ -glucosilceramida, preferentemente en la que el adyuvante comprende un oligonucleótido inmunoestimulador y un oligopéptido poliactílico.
- 15     8. La composición de la reivindicación 7, en la que el adyuvante es MF59.
- 20     9. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el glucano tiene una polidispersidad (Mw/Mn) de 1,01 o menos.
- 20     10. Una composición de cualquier reivindicación precedente, para su uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar al mamífero la composición.

*Figura 1*

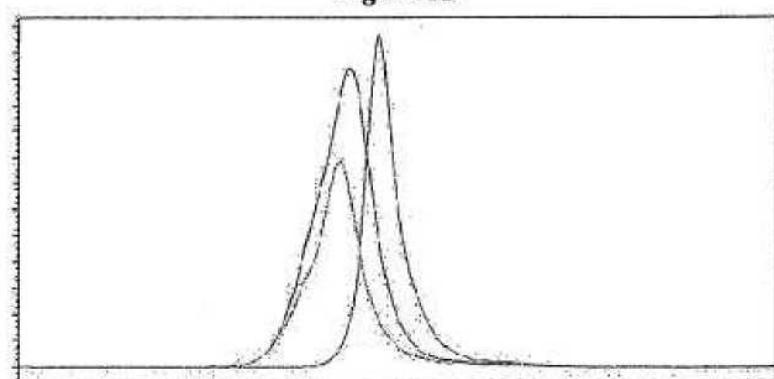


*Figura 2*

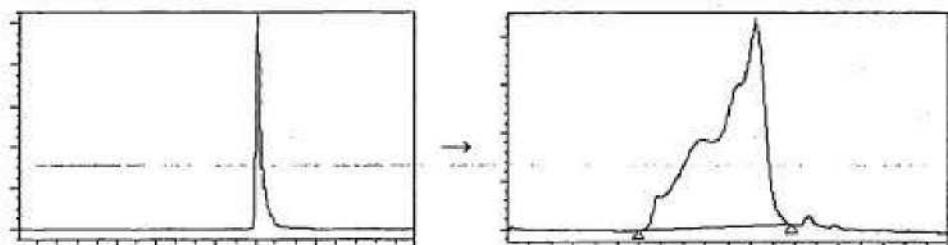
*Figura 2A*

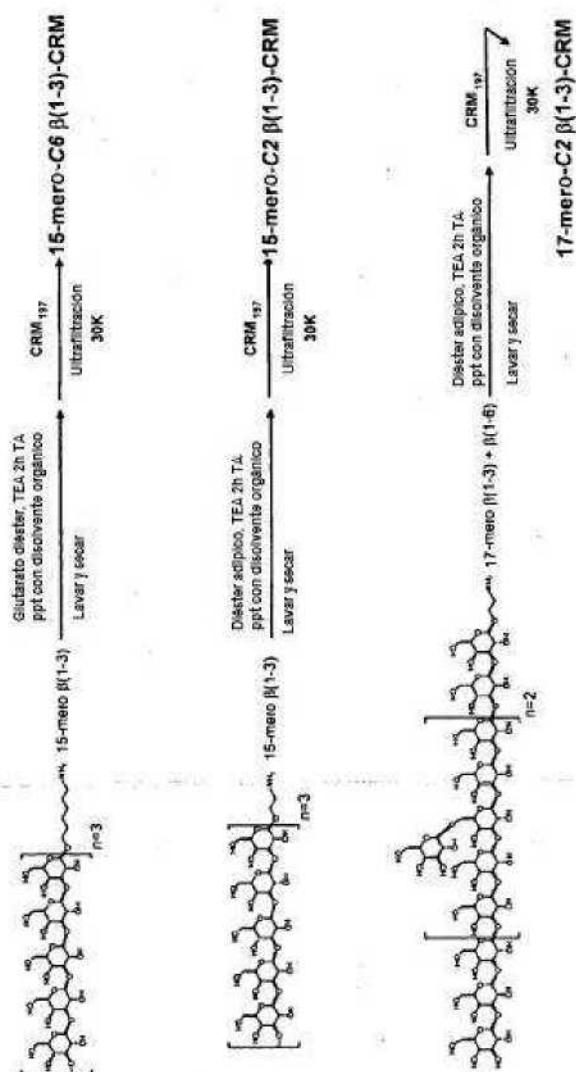


*Figura 2B*

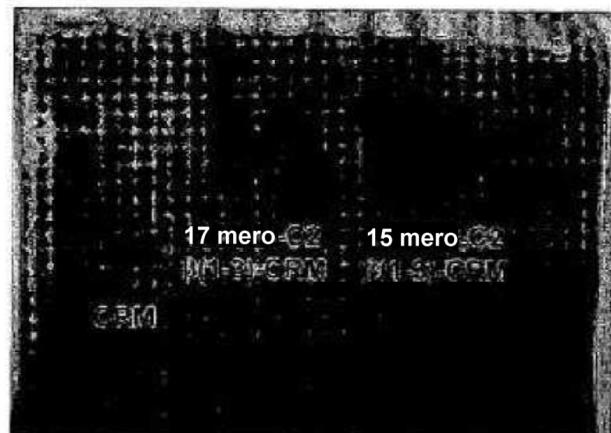
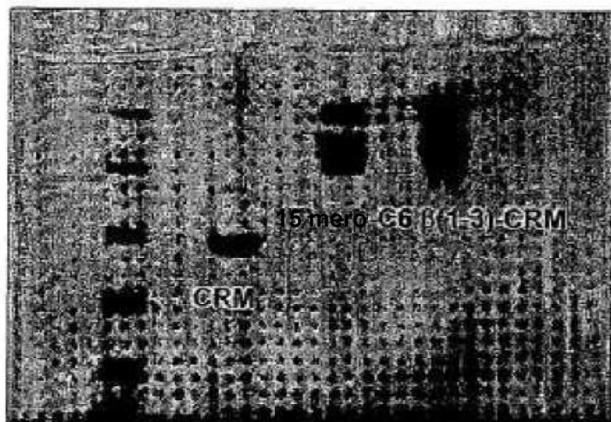


**Figura 3**

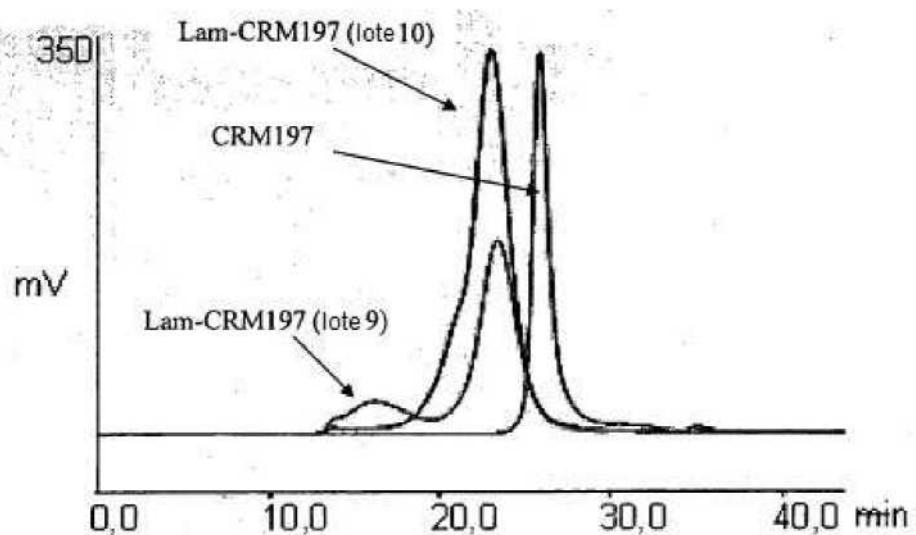


*Figura 4*

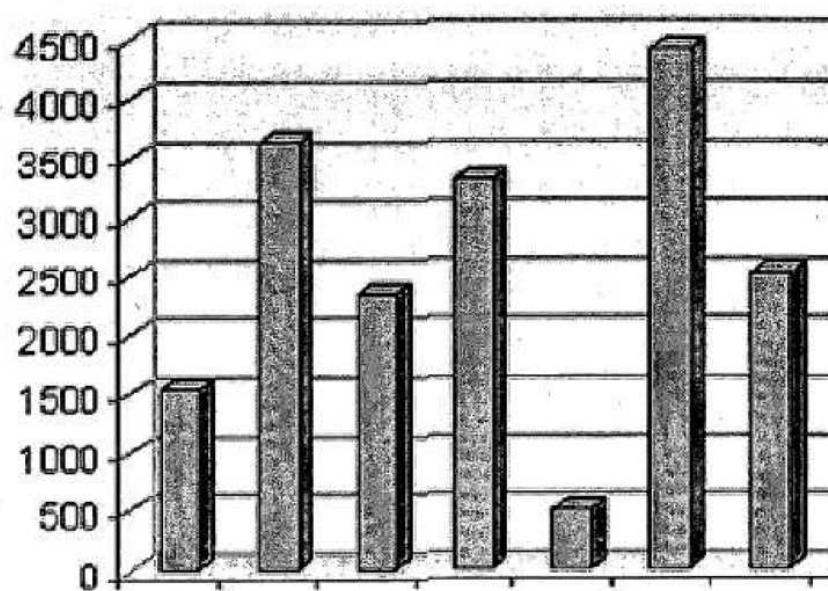
*Figura 5*

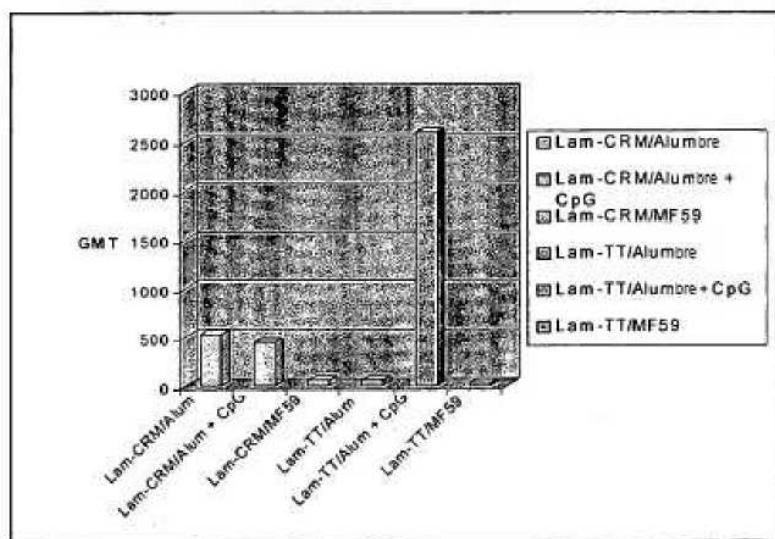
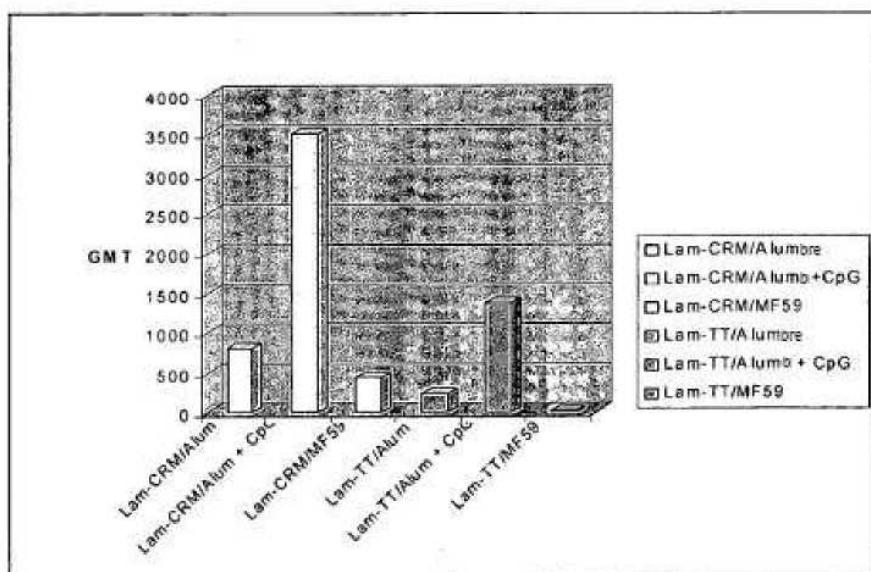


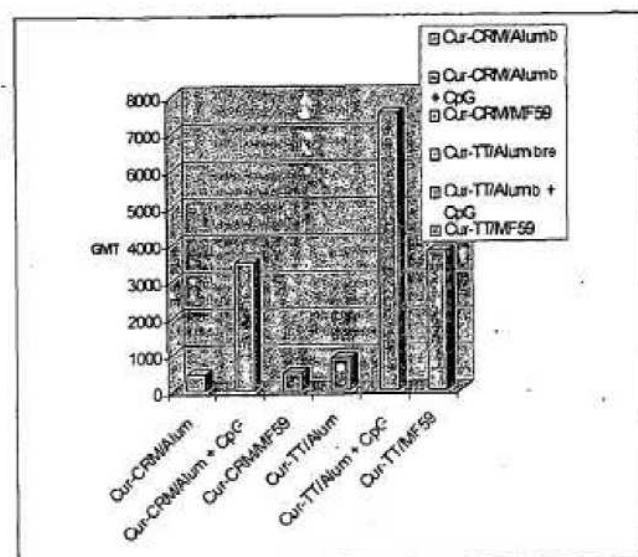
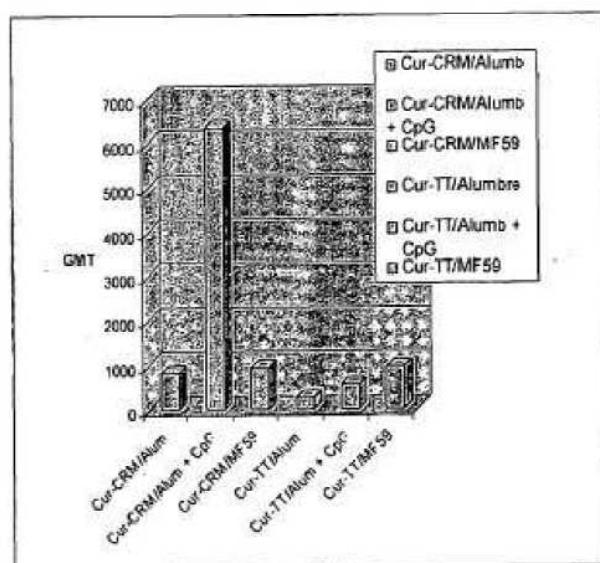
**Figura 6**



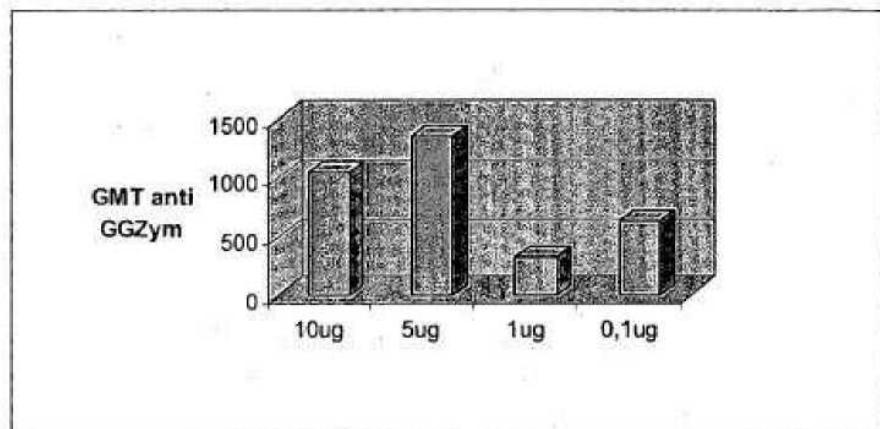
*Figura 7*



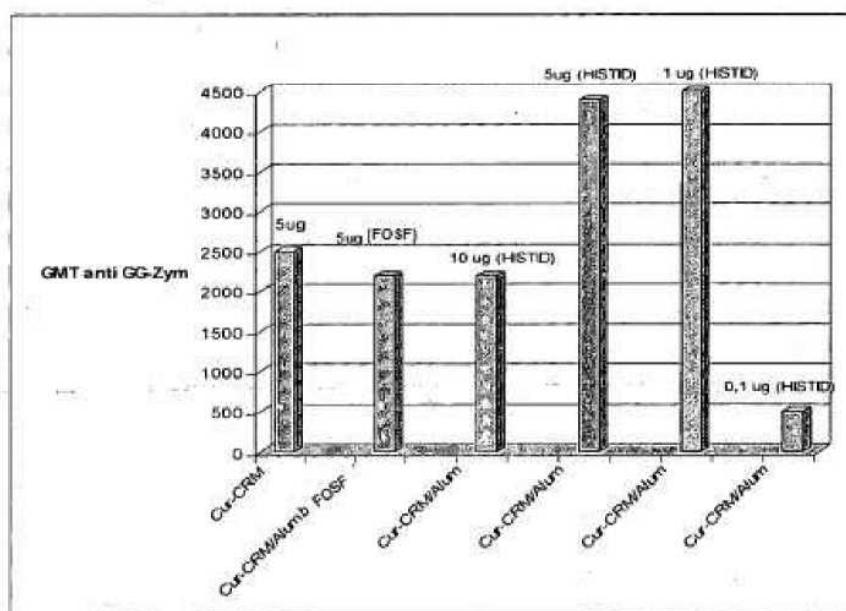
**Figura 8****Figura 9**

**Figura 10****Figura 11**

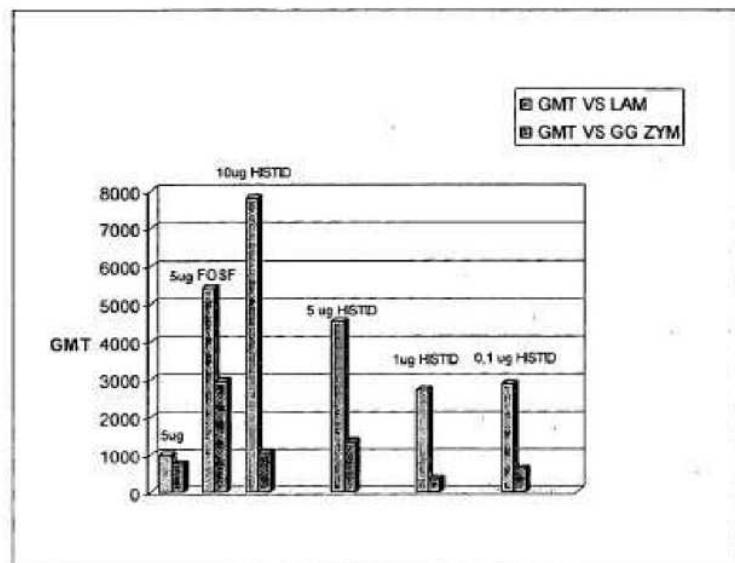
**Figura 12**



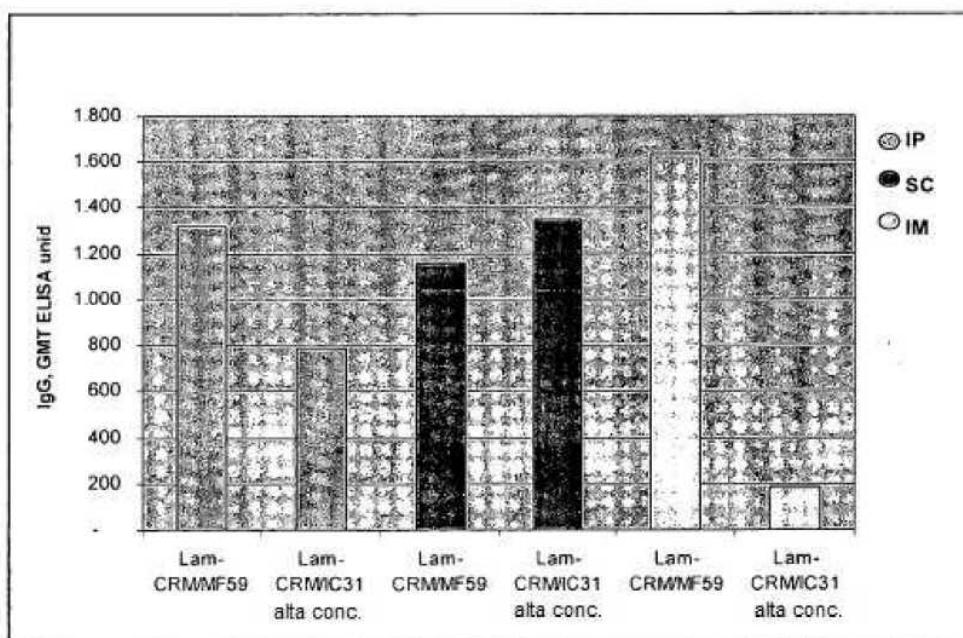
**Figura 13**

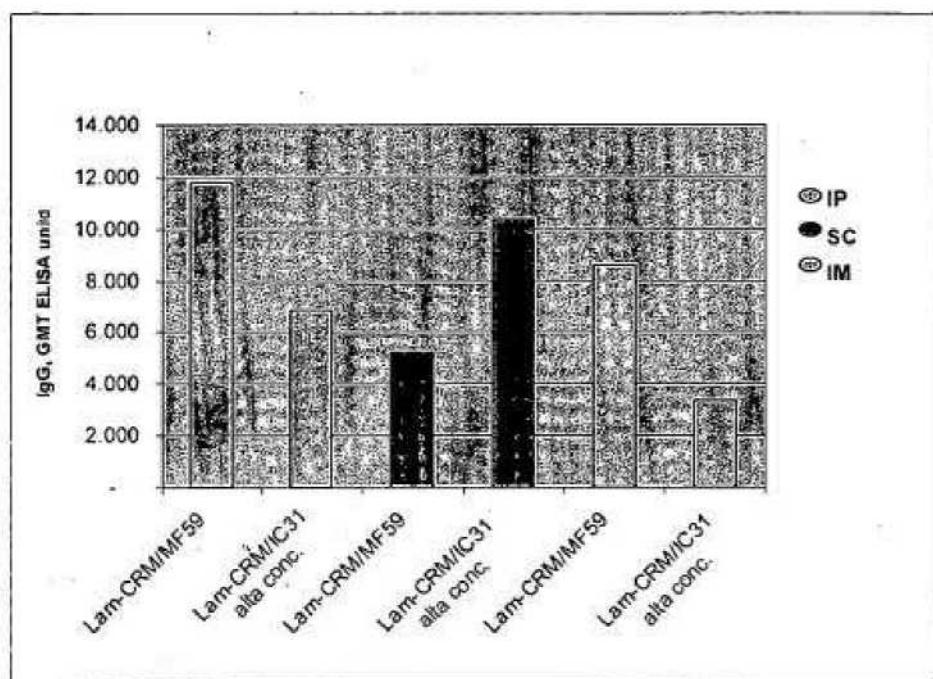


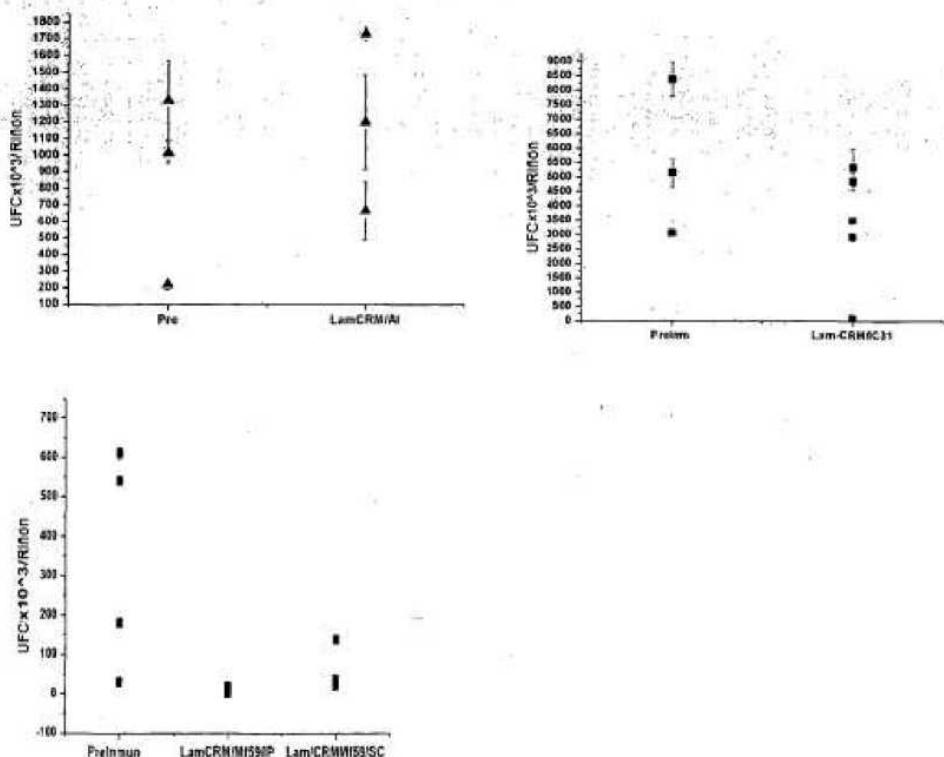
*Figura 14*



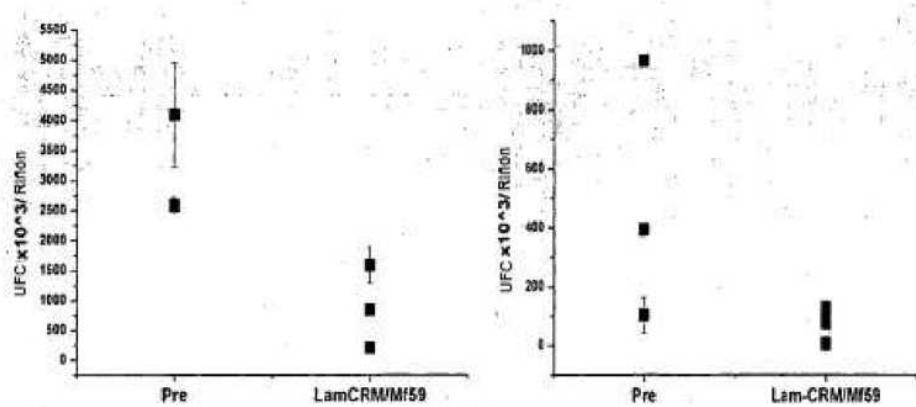
*Figura 15*



**Figura 16**

**Figura 17**

*Figura 18*



*Figura 19*



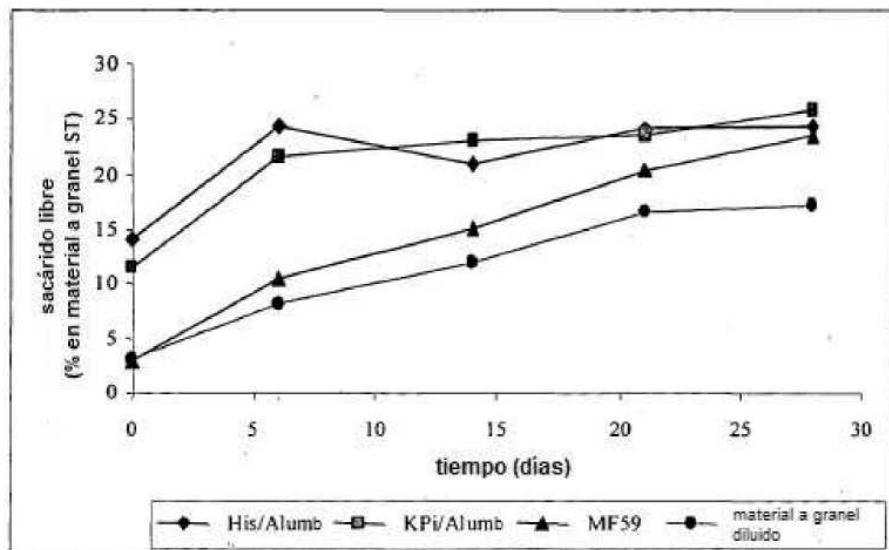
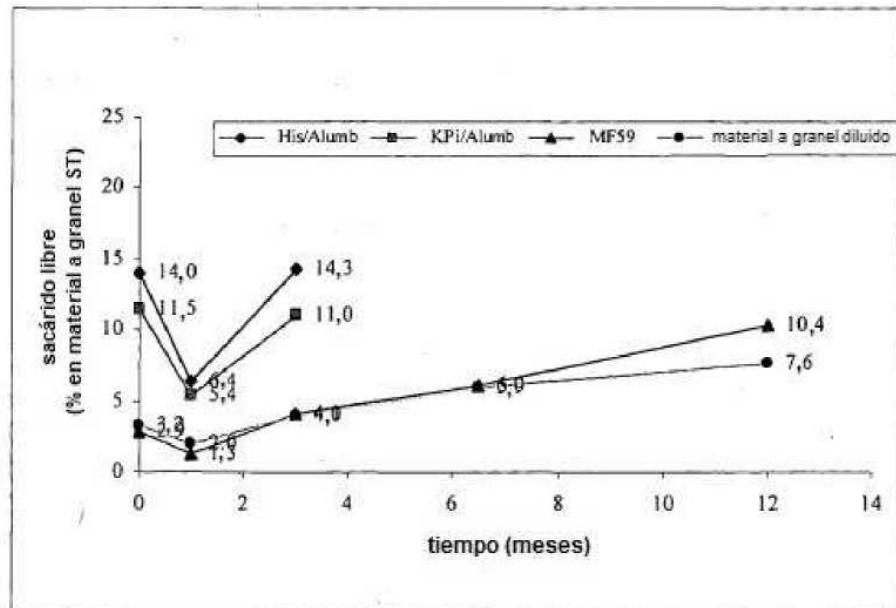
**Figura 20****Figura 21**

Figura 22

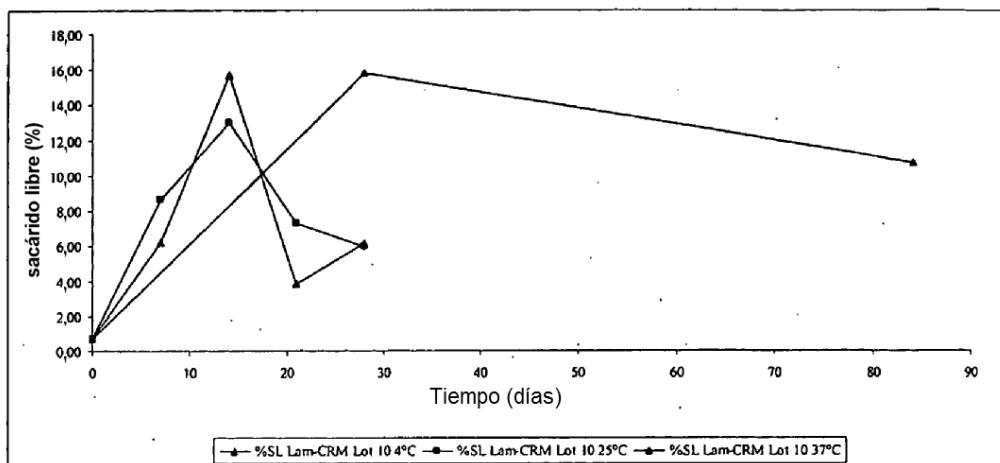
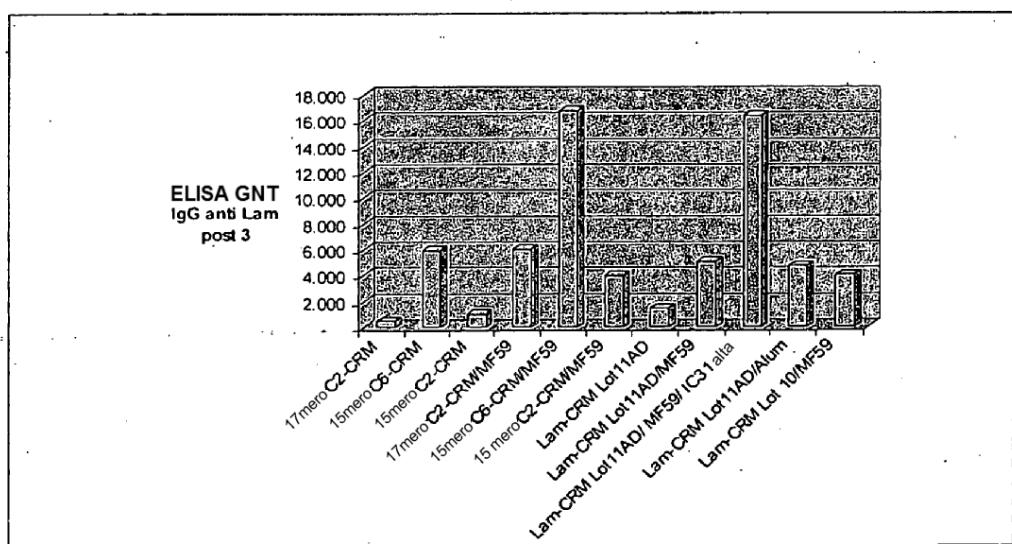
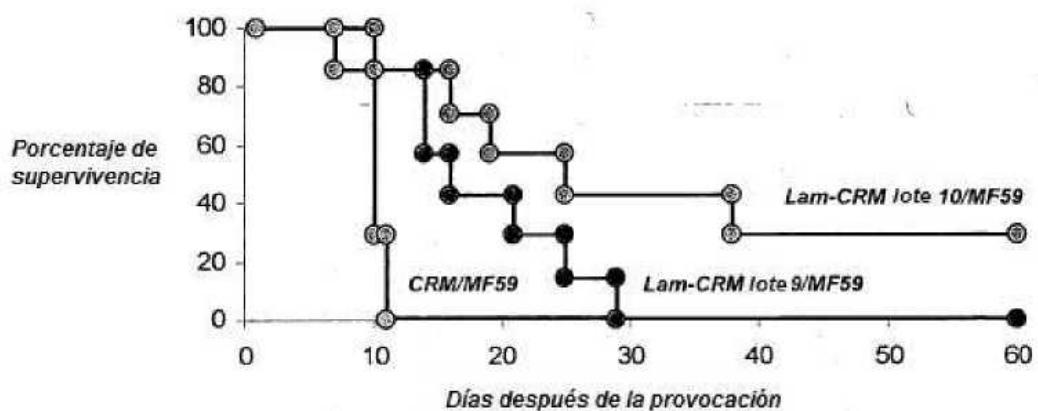
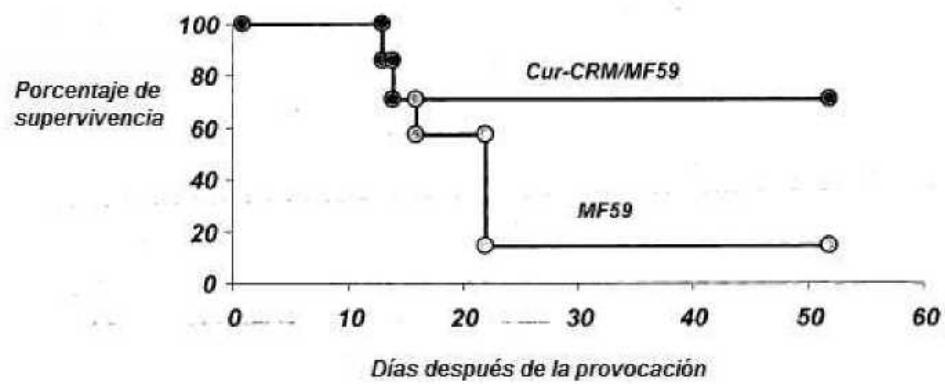


Figura 23



**Figura 24****Figura 25**

**Figura 26**