

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 816**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

B01D 61/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2010** **PCT/IB2010/002556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011** **WO11036562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2010** **E 10769061 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **14.07.2021** **EP 2482847**

54 Título: **Purificación de vesículas bacterianas**

30 Prioridad:

28.09.2009 GB 0917003

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
10.02.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DL CIOCCIO, VITO;
COLUCCI, ANNA MARIA y
SAUL, ALLAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 466 816 T5

DESCRIPCIÓN

Purificación de vesículas bacterianas

5 Campo técnico

La presente invención está en el campo de purificar vesículas de bacterias Gram-negativas.

Técnica anterior

10 Las bacterias Gram-negativas pueden liberar espontáneamente ampollas de la membrana externa durante el crecimiento debido a la presión de turgencia de la envoltura de la célula. La formación de tales ampollas puede facilitarse por la alteración de ciertos componentes bacterianos, por ejemplo, las referencias 1 y 2 alteraron la enzima MltA de meningococo proporcionando cepas que liberan vesículas en el medio de cultivo durante el crecimiento, y las referencias 2 y 3 alteraron el sistema Tol-Pal de *E. coli* para el mismo fin.

Las vesículas de la membrana externa (VME) también pueden producirse por alteración de la bacteria completa. Procedimientos de producción de VME conocidos incluyen procedimientos que usan tratamiento con detergente (por ejemplo, con desoxicolato) [4 y 5], procedimientos sin detergente [6], o sonicación [7], etc.

20 Se han usado diversos procedimientos para purificar estas vesículas inmunogénicas (es decir, ampollas y VME). Por ejemplo, la referencia 8 informa de un procedimiento basado en ultrafiltración.

Aunque eficaces, estos procedimientos requieren mucho trabajo y son caros, particularmente debido al uso de centrifugación. Así, los procedimientos no son adecuados para la producción de vacunas de bajo coste contra enfermedades que son comunes en países en desarrollo, por ejemplo, contra shigelosis. Así, existe la necesidad de un procedimiento más simple y más barato para la purificación de vesículas bacterianas inmunogénicas.

Divulgación de la invención

30 La invención se refiere a un procedimiento de filtración por tamaño de dos etapas para purificar vesículas bacterianas inmunogénicas. Una primera etapa separa las vesículas de bacterias intactas basándose en sus diferentes tamaños, pasando las vesículas más pequeñas al filtrado (permeado). Entonces, una segunda etapa usa un filtro más fino para eliminar contaminantes más pequeños (por ejemplo, proteínas solubles), quedando las vesículas en el concentrado. Este procedimiento de dos etapas es extremadamente simple de operar, pero da vesículas inmunogénicas de alta pureza.

Así, la invención proporciona un procedimiento para purificar vesículas bacterianas inmunogénicas, obtenidas mediante alteración de o vesiculación desde la membrana externa de bacterias, de una composición que incluye tanto bacterias completas como las vesículas obtenidas a partir de las mismas, que consiste en: (i) una primera etapa de filtración de flujo tangencial en la que las vesículas se separan de las bacterias basándose en sus diferentes tamaños, pasando las vesículas al filtrado; y (ii) una segunda etapa de filtración de flujo tangencial en la que las proteínas solubles en el filtrado son retiradas de las vesículas y las vesículas son retenidas en el concentrado. Las vesículas retenidas pueden usarse como componente inmunogénico en una vacuna.

45 También se desvela una composición que contiene vesícula obtenida u obtenible por este procedimiento.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, tal como una vacuna, que comprende las etapas: (a) purificar vesículas bacterianas inmunogénicas mediante un procedimiento de la invención; y (b) formular las vesículas purificadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un tampón) y/o con un adyuvante inmunológico y/o con uno o más componentes adicionalmente inmunogénicos.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, tal como una vacuna, que comprende una etapa de formular vesículas purificadas mediante un procedimiento de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un tampón) y/o con un adyuvante inmunológico y/o con uno o más componentes adicionalmente inmunogénicos.

También se desvela una composición farmacéutica que contiene vesículas obtenidas u obtenibles por estos procedimientos.

60 Las vesículas

La invención puede usarse para purificar diversos tipos de vesículas proteoliposómicas que retienen proteínas de la membrana externa de bacterias. Esta vesícula proteoliposómica puede obtenerse por alteración o vesiculación de la membrana externa de una bacteria para formar vesículas a partir de la misma que incluyen componentes de proteína de la membrana externa. Así, el término incluye VME, ampollas, microvesículas (MV [9]) y 'VME nativas' ('VMEN' [10]).

También puede incluir VME extraídas con detergente (VMED) y VME derivadas de mutante (VME-m).

Ampollas, MV y VMEN son vesículas de membrana que se producen naturalmente que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y son liberadas al medio de cultivo. Las MV pueden obtenerse cultivando bacterias tales como *Neisseria* en medio de cultivo de caldo, separando células completas de las MV más pequeñas en el medio de cultivo de caldo (por ejemplo, por filtración o por centrifugación a baja velocidad para sedimentar solo las células y no las vesículas más pequeñas), y luego recogiendo las MV del medio agotado en células (por ejemplo, por filtración, por precipitación diferencial o agregación de MV, por centrifugación a alta velocidad para sedimentar las MV). Cepas para su uso en la producción de MV pueden seleccionarse generalmente basándose en la cantidad de MV producidas en cultivo, por ejemplo, las ref. 11 y 12 describen *Neisseria* con alta producción de MV. La hipervesiculación de cepas se desvela en la referencia 13. La alteración del gen *mltA* [1, 2] también puede proporcionar cepas meningocócicas que liberan espontáneamente vesículas adecuadas durante el cultivo. La alteración del sistema Tol-Pal puede usarse para proporcionar cepas de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* que liberan espontáneamente vesículas adecuadas durante el cultivo.

Las VME se preparan artificialmente a partir de bacterias, y pueden prepararse usando tratamiento con detergente (por ejemplo, con desoxicolato o sarcosilo), o por medios sin detergente (por ejemplo, véase la referencia 14). Técnicas para formar VME incluyen tratar bacterias con un detergente de sal de ácido biliar (por ejemplo, sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., siendo preferido el desoxicolato de sodio [15 y 16] para tratar *Neisseria*) a un pH suficientemente alto para no precipitar el detergente [17]. Otras técnicas pueden realizarse sustancialmente en ausencia de detergente [14] usando técnicas tales como sonicación, homogeneización, microfluidización, cavitación, choque osmótico, molienda, prensa francesa, mezcla, etc. Procedimientos que no usan detergente o poco detergente pueden retener antígenos útiles tales como NspA [14]. Así un procedimiento puede usar un tampón de extracción de VME con aproximadamente el 0,5 % de desoxicolato o menos, por ejemplo, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,1 %, <0,05 % o cero.

Un procedimiento útil para la preparación de VME se describe en la referencia 18 e implica ultrafiltración sobre VME en brutas, en vez de en lugar de centrifugación a alta velocidad. El procedimiento puede implicar una etapa de ultracentrifugación después de tener lugar la ultrafiltración.

Si LOS está presente en una vesícula es posible tratar la vesícula de manera que enlace su LOS y componentes de proteína (conjugación "intra-ampollas" [19]).

Vesículas preferidas para su uso con la invención se producen por una bacteria *Shigella* (por ejemplo, una *S. sonnei*) que no expresa una proteína TolR funcional. Otras vesículas para su uso con la invención se producen por una bacteria *Salmonella* (por ejemplo, una *S. typhimurium*, también conocida como *Salmonella enterica* serovariedad *Typhimurium*) que no expresa una proteína TolR funcional.

La bacteria

La invención puede usarse para purificar vesículas de diversas bacterias Gram-negativas tales como especies en cualquiera de los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Vibrio*, etc.

Por ejemplo, la bacteria puede ser *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* (incluyendo cepas no tipables), *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* (incluyendo las serovariedades *typhi* y *typhimurium*, además de las serovariedades *paratyphi* y *enteritidis*), *Vibrio cholerae*, etc.

La invención es particularmente adecuada para preparar vesículas de *Shigella* (tales como *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* o *S. sonnei*) y *E. coli* (incluyendo cepas patógenas extraintestinales) y *Salmonella* (incluyendo *S. typhimurium*).

La bacteria puede ser una bacteria natural pero, más normalmente, habrá sido modificada, por ejemplo, para inactivar genes que conducen a un fenotipo tóxico. Por ejemplo, se conoce modificar bacterias de manera que no expresen un lipopolisacárido (LPS) nativo, particularmente para *E. coli*, meningococo, *Shigella*, y similares. Pueden hacerse diversas modificaciones de LPS nativo, por ejemplo, éstas pueden alterar la estructura del lípido A nativo, el núcleo del oligosacárido, o el antígeno O externo. La ausencia del antígeno O en el LPS es útil, ya que es ausencia de lípido A hexa-acilado. La inactivación de enterotoxinas también es conocida, por ejemplo, para prevenir la expresión de toxina Shiga.

Una bacteria preferida para su uso con la invención es una cepa de *S. sonnei* con un genotipo $\Delta tolR$, que incluye una cepa con un genotipo $\Delta tolR\Delta galU$.

La primera filtración

La primera etapa de filtración de flujo tangencial separa las vesículas de bacterias intactas basándose en sus diferentes tamaños, pasando las vesículas más pequeñas al filtrado (permeado).

5 La entrada para la primera etapa de filtración de flujo tangencial puede ser el producto de un procedimiento de formación de vesículas (por ejemplo, un procedimiento de preparación de VME a partir de meningococos). Aunque, normalmente, la entrada será el medio de cultivo de una bacteria de vesiculación.

10 Esta etapa puede ser una filtración estéril típica, por ejemplo, usando un filtro de 0,22 µm. Las bacterias son retenidas por el filtro, pero las vesículas pasan a través al filtrado.

En general, el tamaño de poro para la primera filtración se seleccionará según el tamaño y características de las bacterias que van a eliminarse. El objetivo de la primera etapa de filtración es retener más del 90 % (en número) de bacterias intactas, idealmente >95 %, >97 %, >98 %, >99 % o >99,5 %, y por consiguiente puede seleccionarse un tamaño de poro. Para algunas bacterias (por ejemplo, aquellas con grandes células), la primera etapa de filtración puede ser filtración a través de una membrana de 0,8 µm, 0,65 µm o 0,45 µm de tamaño de poro, pero para otras bacterias (por ejemplo, aquellas con células pequeñas) la primera etapa de filtración puede ser a través de una membrana de 0,22 µm o 0,2 µm de tamaño de poro. Diversas membranas adecuadas están comercialmente disponibles.

La primera etapa de filtración se realiza con una disposición de flujo tangencial (flujo cruzado). Esta disposición ayuda a evitar la obstrucción que es típica para filtración en línea y minimiza la necesidad de una amplia prefiltración. Prefiltración reducida significa que un menor volumen de líquido queda atrapado en los filtros. Los casetes de microfiltración de flujo tangencial se evaluaron en las referencias 20 y 21, y están comercialmente disponibles, por ejemplo, la gama MaxCell™ de cartuchos de fibra hueca con 0,2 µm de tamaño de poro, o los cartuchos MidGee™ con 0,2 µm de tamaño de poro, o los cartuchos de fibra hueca ProCell™ con 0,2 µm de tamaño de poro (todos disponibles de GE Healthcare).

30 La filtración de flujo tangencial en la primera etapa se realiza idealmente con diafiltración. Esto permite la eficiente eliminación de componentes del filtrado e implica la adición de disolvente fresco (por ejemplo, un tampón tal como PBS) durante la primera etapa de filtración. La adición del disolvente fresco puede mantener el volumen global si se produce a la misma tasa que la eliminación de disolvente a través del filtro de flujo tangencial.

35 La primera etapa de filtración puede usar una membrana de fibra hueca, por ejemplo, para reducir la tensión de cizallamiento sobre las vesículas.

La segunda filtración

40 La segunda etapa de filtración de flujo tangencial usa un filtro más fino que la primera etapa. Mientras que las vesículas pasaron al filtrado en la primera etapa de filtración, en la segunda etapa de filtración permanecen en el concentrado.

En general, el tamaño de poro para la segunda filtración se seleccionará según el tamaño y características de las vesículas que van a retenerse. Algunas vesículas pequeñas pueden pasar a través del filtro, pero el objetivo de la segunda etapa de filtración es retener más del 50 % (en número) de vesículas, idealmente >60 %, >70 %, >80 %, >90 % o >95 %, mientras que se eliminan proteínas solubles. Por consiguiente, puede seleccionarse un tamaño de poro basándose en las vesículas que van a retenerse y las proteínas solubles que van a eliminarse. Idealmente, >90 % de la proteína total en el concentrado debe ser parte de las vesículas, con <10 % como proteína soluble. Filtros adecuados se estiman normalmente en términos de su tamaño de poro (por ejemplo, un filtro adecuado puede tener un tamaño de poro de 0,1 µm) o peso molecular (por ejemplo, puede usarse una membrana de 300 kDa, 500 kDa, 750 kDa o 1000 kDa). Diversas membranas adecuadas están comercialmente disponibles.

La segunda etapa de filtración se realiza con una disposición de flujo tangencial (flujo cruzado). Como se trata anteriormente, esta disposición ayuda a evitar obstrucciones. Los casetes de microfiltración de flujo tangencial están comercialmente disponibles, por ejemplo, la gama MaxCell™ de cartuchos de fibra hueca con 0,1 µm de tamaño de poro, o los cartuchos MidGee™ con 0,1 µm de tamaño de poro, o cartuchos de laboratorio Xampler™ con 0,1 µm de tamaño de poro (todos disponibles de GE Healthcare).

La filtración de flujo tangencial en la segunda etapa se realiza idealmente con diafiltración (véase anteriormente).

60 La segunda etapa de filtración puede usar una membrana de fibra hueca, por ejemplo, para reducir la tensión de cizallamiento sobre las vesículas.

El concentrado de la segunda etapa de filtración contiene vesículas y éstas pueden resuspenderse en cualquier medio adecuado (por ejemplo, en un tampón u otro líquido farmacéuticamente aceptable) listo para la formulación en una vacuna.

Composiciones farmacéuticas

5 La invención proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende (a) purificar vesículas mediante un procedimiento de la invención y (b) formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición tal que comprende la etapa de mezclar vesículas purificadas mediante un procedimiento de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La composición inmunogénica puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser cualquier sustancia que por sí misma no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el paciente que recibe la composición y que pueda administrarse sin excesiva toxicidad. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH, y similares, también pueden estar presentes en
15 tales vehículos. Una discusión meticulosa de vehículos adecuados está disponible en la ref. 22.

Las bacterias pueden afectar diversas áreas del cuerpo y entonces las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en,
20 o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración por vía oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un espray. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para
25 administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo, como gotas.

Un vehículo farmacéutico puede incluir un agente protector de la temperatura, y este componente puede ser particularmente útil en composiciones adyuvantadas (particularmente aquellas que contienen un adyuvante mineral, tal como una sal de aluminio). Como se describe en la referencia 23, un agente protector de la temperatura líquido
30 puede añadirse a una composición acuosa de vacuna para reducir su punto de congelación, por ejemplo, para reducir el punto de congelación a por debajo de 0 °C. Así, la composición puede almacenarse por debajo de 0 °C, pero por encima de su punto de congelación, para inhibir la descomposición térmica. El agente protector de la temperatura también permite la congelación de la composición mientras que se protegen adyuvantes de sales minerales contra la aglomeración o sedimentación después de la congelación y descongelación, y también puede proteger la composición
35 a temperaturas elevadas, por ejemplo, por encima de 40 °C. Una vacuna acuosa de partida y el agente protector de la temperatura pueden mezclarse de forma que el agente protector de la temperatura líquido forme el 1-80 % en volumen de la mezcla final. Los agentes protectores de la temperatura adecuados deben ser seguros para administración humana, fácilmente miscibles/solubles en agua, y no deben dañar otros componentes (por ejemplo, antígeno y adyuvante) en la composición. Ejemplos incluyen glicerina, propilenglicol y/o polietilenglicol (PEG). Los
40 PEG adecuados pueden tener un peso molecular promedio que oscila de 200-20.000 Da. En una realización preferida, el polietilenglicol pueden tener un peso molecular promedio de aproximadamente 300 Da ('PEG-300').

La composición es preferentemente estéril. Está preferentemente libre de pirógenos. Está preferentemente tamponada, por ejemplo, a entre pH 6 y pH 8, generalmente aproximadamente pH 7. Las composiciones de la
45 invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de vesículas inmunogénicas, además de cualquier otro de los otros componentes especificados, según se necesite. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz' se indica que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o
50 como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que va a tratarse, edad, el grupo taxonómico del individuo que va a tratarse (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 del médico práctico de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente ancho que pueda
55 determinarse mediante ensayos rutinarios.

El trabajo previo con vacunas de vesícula (por ejemplo, para meningococo) ofrece orientación farmacéutica, posológica y de formulación para composiciones de la invención. La concentración de vesículas en composiciones de la invención estará generalmente entre 10 y 500 µg/ml, preferentemente entre 25 y 200 µg/ml, y más preferentemente
60 aproximadamente 50 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml (expresada en términos de proteína total en las vesículas). Un volumen de dosificación de 0,5 ml es típico para inyección.

La composición puede administrarse conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores.

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

A. Composiciones que contienen minerales

Composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 27], o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen mineral también pueden formularse como partícula de sal metálica.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son normalmente sales de oxihidróxido de aluminio, que son normalmente al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse por la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, por espectroscopía de infrarrojos (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un fuerte hombro a $3090\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ [capítulo 9 de la ref. 27]. El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a la mitad de la altura (WHH), mostrando partículas escasamente cristalinas mayor ensanchamiento de la línea debido a tamaños de cristales más pequeños. El área superficial aumenta a medida que aumenta WHH, y se ha observado que adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad para la adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica para adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es normalmente aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se ha informado de capacidades adsorptivas de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son normalmente hidroxifosfatos de aluminio, que frecuentemente también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato-sulfato de aluminio). Pueden obtenerse mediante precipitación, y las condiciones de reacción y concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una relación molar de PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse del AlPO_4 estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda del espectro de IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, a $200\text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales [Cap. 9 de la ref. 27].

La relación molar de $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio estará generalmente entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con relación molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluidos 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio estará generalmente particulado (por ejemplo, morfología similar a placas como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Diámetros típicos de las partículas están en el intervalo 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se ha informado de capacidades adsorptivas de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

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

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

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

La concentración de Al^{+++} en una composición para administración a un paciente es preferentemente inferior a 10 mg/ml, por ejemplo, $\leq 5\text{ mg/ml}$, $\leq 4\text{ mg/ml}$, $\leq 3\text{ mg/ml}$, $\leq 2\text{ mg/ml}$, $\leq 1\text{ mg/ml}$, etc. Un intervalo preferido es entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de $<0,85\text{ mg/dosis}$.

B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 [Capítulo 10 de la ref. 27; véase también la ref. 24] (5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85, formulado en partículas submicrométricas usando un

microfluidizador). También pueden usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Se conocen diversas emulsiones de aceite en agua adecuadas, y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el (los) aceite(s) y tensioactivo(s) biodegradable(s) (metabolizable(s)) y biocompatible(s). Las gotitas de aceite en la emulsión tienen generalmente menos de 5 µm en diámetro, y ventajosamente la emulsión comprende gotitas de aceite con un diámetro submicrométrico, consiguiéndose estos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño inferior a 220 nm ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

La invención puede usarse con aceites tales como aquellos de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Fuentes para aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. El aceite de jojoba puede usarse, por ejemplo, obtenido de la judía de la jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de alazor, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos de cereal tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, tritical y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen naturalmente en aceites de semilla, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados a partir de aceites de frutos secos y de semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y pueden, por tanto, usarse en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuente de animal son muy conocidos en la técnica. La mayoría de los pescados contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena tal como espermaceti ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden usarse en el presente documento. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y generalmente se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Las emulsiones de aceite en agua que comprenden escualeno son particularmente preferidas. Pueden usarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo). Tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitano (comúnmente denominados los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/o óxido de butileno (OB), comercializados bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloques de OE/OP lineales; octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodifilo) de repetición, siendo el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipoli-etoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como monolauril éter de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitano (comúnmente conocidos como los SPAN), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100. Como se ha mencionado anteriormente, detergentes tales como Tween 80 pueden contribuir a la estabilidad térmica observada en los ejemplos más adelante.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitano tal como monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipoli-etoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauril éter 9 más un éster de polioxietilensorbitano y/o un octoxinol.

Cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilensorbitano (tales como Tween 80) 0,01 al 1 %, en particular aproximadamente 0,1 %; octil- o nonilfenoxipoli-etoxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) 0,001 al 0,1 %, en particular 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como lauril éter 9) 0,1 al 20 %, preferentemente 0,1 al 10 % y en particular 0,1 al 1 % o aproximadamente 0,5 %.

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 aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas relaciones se convierten en 4,3 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [24-26], como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 27 y el Capítulo 12 de la ref. 28. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.
- Una emulsión que comprende escualeno, un α -tocoferol y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de tocoferol y del 0,3 al 3 % de Tween 80, y la relación de peso de

escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 (por ejemplo, 0,90), ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una relación de volumen de aproximadamente 5:2, o a una relación de peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión tal puede prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una disolución al 2 %, luego mezclando 90 ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir 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 α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación másica de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir 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 muramildipéptidos y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [29] (0,05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualano, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). También puede usarse sin Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [30] (5 % de escualano, 1,25 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter alquílico de polioxietileno (por ejemplo, éter cetosteárilico de polioxietileno (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitano o éster de manida, tal como monooleato de sorbitano o 'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos el 90 % de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [31]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. Tales emulsiones pueden liofilizarse.

- Una emulsión que tiene 0,5-50 % de un aceite, 0,1-10 % de un fosfolípido y 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 32, componentes de fosfolípido preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos tamaños de gotita submicrométricos.

- Una emulsión de aceite en agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos tales como la saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 33, producido mediante adición de amina alifática a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetildiocetadecilamonio y/o N,N-diocetadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno) [34].

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno) [34].

- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo, un colesterol) están asociados como micelas helicoidales [35].

Los antígenos y adyuvantes en una composición normalmente estarán en mezcla en el momento de la administración a un paciente. Las emulsiones pueden mezclarse con antígeno durante la fabricación, o extemporáneamente, en el momento de la administración. Así, el adyuvante y el antígeno pueden mantenerse por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para formulación final en el momento de uso. El antígeno estará generalmente en una forma acuosa, de forma que la vacuna se prepare finalmente mezclando dos líquidos. La relación de volumen de los dos líquidos para la mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5), pero es generalmente aproximadamente 1:1.

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 27]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos,

las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 36. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide tal como colesterol [37].

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM; véase el capítulo 23 de la ref. 27; también las ref. 38 y 39). Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente adicional [40].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina puede encontrarse en las ref. 41 y 42.

D. Derivados bacterianos o microbianos

Adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en la ref. 43. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son demasiado pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros [43]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529 [44, 45].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las ref. 46 y 47.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar ligada por un enlace fosfato a una guanina). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 48, 49 y 50 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, sustitución de guanina con 2'-desoxi-7-deazaguanina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en las ref. 51-56.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [57]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las ref. 58-60. Preferentemente, CpG es CpG-A ODN.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las ref. 61-63.

Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimulantes se conoce como IC-31™ [64-66]. Así, un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) que incluye al menos uno (y preferentemente múltiples) motivos Cpl (es decir, una citosina ligada a una inosina para formar un dinucleótido), y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluye al menos uno (y preferentemente múltiples) secuencia(s) de tripéptidos Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende la secuencia 26-mera 5'-(IC)₁₃-3' (SEC ID N°: 7). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende la secuencia 11-mera de aminoácidos KLKLLLLLKLK (SEC ID N°: 6). Esta combinación de SEC ID N°: 6 y 7 proporciona el adyuvante IC-31™.

Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes

de la mucosa se describe en la ref. 67 y como adyuvantes parenterales en la ref. 68. La toxina o toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende tanto las subunidades A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las ref. 69-76. Un mutante de CT útil es el CT-E29H [77]. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 78, incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

E. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [79], etc.) [80], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferido es IL-12.

F. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [81] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [82].

G. Micropartículas

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

H. Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 27)

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las ref. 83-85.

I. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las ref. 86 y 87.

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes pueden usarse en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [88]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [89]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [90]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [91]; (6) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de Tween 80™, 5 % de Pluronic-polímero de bloques L121, y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula. (7) El sistema de adyuvantes Ribi™ (RAS) (Ribi Immunochem) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 27.

Un adyuvante de hidróxido de aluminio es útil, y los antígenos se adsorben generalmente a esta sal. También se prefieren emulsiones de aceite en agua que comprenden escualeno, con gotitas de aceite submicrométricas, particularmente en los ancianos. Combinaciones de adyuvantes útiles incluyen combinaciones de adyuvantes Th1 y Th2 tales como CpG y una sal de aluminio, o resiquimod y una sal de aluminio. Puede usarse una combinación de una sal de aluminio y 3dMPL.

Inmunización

Las composiciones producidas por el procedimiento de la invención también encuentran uso en un procedimiento para

producir una respuesta de anticuerpos en un mamífero, que comprende administrar una composición inmunogénica de la invención al mamífero. La respuesta de anticuerpos es preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora.

- 5 Las composiciones también encuentran uso en un procedimiento para proteger un mamífero contra una infección y/o enfermedad bacteriana, que comprende administrar al mamífero una composición inmunogénica de la invención.

Las composiciones pueden usarse como medicamentos (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas o como vacunas).

- 10 El mamífero es preferentemente un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o, preferentemente, un niño. Si la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un bebé mayor o lactante); si la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna prevista para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.
- 15 Los usos y procedimientos son particularmente útiles para prevenir/tratar enfermedades producidas por *Shigella* que incluyen, pero no se limitan a, shigelosis, síndrome de Reiter y/o síndrome urémico hemolítico. También son útiles para prevenir/tratar enfermedades producidas por *Salmonella* que incluyen, pero no se limitan a, intoxicación alimentaria y/o diarrea.
- 20 La eficacia del tratamiento terapéutico puede probarse monitorizando la infección bacteriana después de la administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico puede probarse monitorizando respuestas inmunitarias contra proteínas inmunogénicas en las vesículas u otros antígenos después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de composiciones puede determinarse administrándolas para probar sujetos (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad) y luego determinar parámetros serológicos
- 25 convencionales. Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente aproximadamente 4 semanas después de la administración de la composición, y en comparación con valores determinados antes de la administración de la composición. Si se administra más de una dosis de la composición, puede hacerse más de una determinación después de la administración.
- 30 Las composiciones se administrarán generalmente directamente a un paciente. La administración directa puede llevarse a cabo mediante inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o al brazo superior. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero
- 35 alternativamente puede usarse inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es aproximadamente 0,5 ml.
- El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede ir seguido de programa de dosis de refuerzo. El momento adecuado entre la dosis
- 40 de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la sensibilización y el refuerzo, puede determinarse rutinariamente.

Procedimientos de cultivo

- 45 También se desvela en el presente documento un procedimiento para cultivar un bacteria *Shigella*, que comprende cultivar la bacteria bajo condiciones agitadas y aireadas a 37 °C y pH 7,1 con oxígeno disuelto al 30 % de saturación.

General

- 50 El término “que comprende” engloba “que incluye”, además de “que consiste”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

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

- 55 La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Si fuera necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

- 60 Referencias a un porcentaje de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos son los mismos en la comparación de las dos secuencias. Este alineamiento y la homología en porcentaje o identidad de secuencias puede determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en sección 7.7.18 de la referencia 92. Un alineamiento preferido se determina por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afín con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman es muy conocido y
- 65 se desvela en la referencia 93.

La numeración "GI" se usa anteriormente. Un número GI, o "identificador de GenInfo", es una serie de dígitos asignados consecutivamente a cada registro de secuencia procesada por NCBI cuando las secuencias se añaden a sus bases de datos. El número de GI no se parece al registro del número de acceso de la secuencia. Cuando una secuencia se actualiza (por ejemplo, para la corrección, o para añadir más anotación o información) entonces recibe un nuevo número GI. Así nunca se cambia la secuencia asociada a un número GI dado.

Si la invención se refiere a un "epítotope", este epítotope puede ser un epítotope de linfocitos B y/o un epítotope de linfocitos T. Tales epítotos pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [94, 95] o procedimientos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, usando el índice antigénico de Jameson-Wolf [96], enfoques basados en matriz [97], MAPITOPE [98], TEPITOPE [99, 100], redes neurales [101], OptiMer & EpiMer [102, 103], ADEPT [104], Tsites [105], hidrofilia [106], índice antigénico [107] o los procedimientos desvelados en las referencias 108-109, etc.). Los epítotos son las partes de un antígeno que son reconocidas por y se unen a los sitios de unión a antígeno de anticuerpos o receptores de linfocitos T, y también pueden denominarse "determinantes antigénicos".

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra ampollas de la invención purificadas de cultivo.

La Figura 2 muestra análisis de SDS-PAGE de muestras de *Shigella* tomadas (i) antes de la primera filtración, (ii) después de la primera filtración, y (iii) después de la segunda filtración. Cada panel tiene tres carriles que muestran, de izquierda a derecha, proteína total, proteína de vesícula y proteína soluble. La Figura 5 muestra resultados similares para *Salmonella*.

La Figura 3 muestra un traza de SEC de muestras tomadas después de la primera y segunda etapas de filtración.

La Figura 4 ilustra el procedimiento global de la invención.

Modos para llevar a cabo la invención

Cultivo bacteriano

Se preparó una cepa doblemente inactivada de *S. sonnei* usando el sistema λ Red. Los genes *tolR* y *galU* se inactivaron ambos dando una cepa Δ tolR Δ galU. Esta cepa doble mutante libera ampollas de la membrana externa más fácilmente que la cepa natural y no tiene antígeno O en su LPS.

La fermentación de Δ tolR Δ galU de *S. sonnei* se ejecutó bajo las siguientes condiciones: pH 7,1, 37 °C, oxígeno disuelto mantenido al 30 % de saturación controlando la agitación y fijando la aireación máxima. El pH se controló mediante la adición de hidróxido de amonio 4 M. La espuma se controló mediante la adición de 10 % de PPG durante la ejecución. El medio consistió en los siguientes componentes: KH₂PO₄, K₂HPO₄ y extracto de levadura. Después de esterilizar el medio en autoclave, se añadieron glicerol y MgSO₄ antes de la inoculación. El inóculo de cultivo fue del 5 % del volumen del fermentador. El procedimiento de fermentación duró aproximadamente 13 horas y la concentración de células se midió como densidad óptica a 600 nm.

Purificación de ampollas

Vesículas producidas en el caldo de fermentación se purificaron usando dos etapas de FFT (filtración de flujo tangencial) consecutivas: micro-filtración a 0,22 μ m y luego una segunda micro-filtración a 0,1 μ m.

Durante la primera etapa de filtración las vesículas se separaron de la biomasa por FFT a través de un casete de 0,22 μ m de tamaño de poro. La biomasa se concentró primero 4 veces y, después de cinco etapas de diafiltración contra PBS, las vesículas se recogieron en el filtrado.

En la segunda etapa de filtración el filtrado de la FFT de 0,22 μ m se microfiltró adicionalmente a través de un casete de 0,1 μ m de corte, con el fin de purificar las vesículas de proteínas solubles. Las vesículas no pudieron pasar a través del casete de filtro. Después de cinco etapas de diafiltración, el concentrado que contenía las vesículas se recogió.

Para analizar el contenido de proteínas, las muestras de cada etapa del procedimiento se ultra-centrifugaron (2 horas, 200.000 g) y el sedimento (que contenía vesículas) se resuspendió en PBS. El contenido de proteínas de las vesículas (el sedimento) y la fracción soluble (el sobrenadante) se cuantificaron por procedimiento de Bradford y se analizaron por SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

La Figura 2 muestra SDS-PAGE de muestras tomadas (i) antes de la primera filtración, (ii) después de la primera filtración, y (iii) después de la segunda filtración. Las muestras se normalizaron a volumen. La alta pureza de la suspensión de vesículas obtenida después de las dos etapas de FFT es evidente. El carril derecho está casi vacío, que indica una ausencia casi completa de proteínas solubles.

La Figura 3 muestra análisis de SEC de muestras tomadas después de la primera etapa de filtración (pico derecho) y después de la segunda etapa de filtración (pico izquierdo). La flecha indica el pico cromatográfico correspondiente a las vesículas. Después de la primera etapa de filtración, el pico de adsorción UV principal está en el volumen del lecho (MW <13 kDa) mientras que después de la segunda etapa de filtración el pico principal está en el volumen vacío, con casi ninguna señal.

Con el fin de evaluar la eficiencia de la FFT para vesículas, las muestras de recuperación se tomaron del caldo de fermentación durante las etapas de FFT y al final de cada etapa de purificación. Antes de la primera filtración la concentración de proteína fue ~1 g/l con 14 % en las vesículas. Después de la primera etapa de filtración hubo una concentración total similar de proteína y el 15 % estuvo en las vesículas. Después de la segunda etapa de filtración, sin embargo, el contenido de proteína disminuyó 10 veces, pero la proporción localizada en las vesículas ascendió al 90 %.

El rendimiento de vesículas fue 100 mg de proteínas de vesícula por litro de cultivo de fermentación. Esto proporcionaría 4000 dosis de vacuna (considerando 25 µg de proteínas por dosis) por litro de caldo de fermentación.

El producto final purificado se observó con TEM (Figura 1). Las ampollas tienen un tamaño homogéneo de aproximadamente 50 nm de diámetro.

Un enfoque proteómico confirmó que las ampollas son membranas externas esencialmente puras. A diferencia de las vesículas de la membrana externa (VME) convencionales derivadas por alteración de la membrana externa, las ampollas conservan proteínas lipófilas y están esencialmente libres de componentes citoplásmicos y de la membrana interna.

La inmunogenicidad de las ampollas purificadas se confirmó inyectándolas en ratones y observando respuestas inmunitarias específicas contra componentes de las ampollas.

Salmonella

Se preparó una cepa inactivada *tolR* de *S. typhimurium* (Δ tolR de *S. typhimurium*) usando el sistema λ Red. Esta cepa mutante libera ampollas de la membrana externa más fácilmente que la cepa natural.

La fermentación del mutante inactivado se ejecutó bajo las siguientes condiciones: pH 7,1, 37 °C, oxígeno disuelto mantenido al 30 % de saturación controlando la agitación y fijando la aireación máxima. El pH se controló mediante la adición de 30 % de hidróxido de amonio. La espuma se controló mediante la adición de 0,25 g/l de PPG en el medio de fermentación. El inóculo del cultivo fue el 1 % del volumen del fermentador. El procedimiento de fermentación se detuvo después de 14 horas, cuando el cultivo alcanzó una concentración de células de 29 a DO_{600nm} .

El sobrenadante de cultivo que contenía las vesículas se separó de la biomasa de *Salmonella* por FFT a través de un casete de filtro de 0,22 µm de tamaño de poro con un área de filtración de 0,1 m². La biomasa se retuvo sobre el casete y el permeado que contenía las vesículas se recogió. Las proteínas solubles en el permeado se eliminaron de las ampollas por una segunda microfiltración a través de un casete de filtro de 0,1 µm de tamaño de poro (área de filtración de 200 cm²). Tras una concentración de 10 veces el concentrado se sometió a 10 etapas de diafiltración contra PBS y posteriormente se recogió.

Para analizar el contenido de proteínas, muestras de cada etapa del procedimiento se ultra-centrifugaron (2 horas, 200.000 g) y el sedimento que contenía vesículas se resuspendió en PBS. El contenido de proteínas de las vesículas (el sedimento) y la fracción soluble (el sobrenadante) se cuantificaron por procedimiento de Bradford y se analizaron por SDS-PAGE (Figura 5). Todas las muestras se normalizaron a volumen.

REFERENCIAS

- [1] Ferrari y col. (2006) Proteomics 6(6):1856-66.
- [2] WO2006/046143.
- [3] Berlanda Scorza y col. (2008) Mol Cell Proteomics 7:473-85.
- [4] Patente europea 0011243.
- [5] Fredriksen y col. (1991) NIPH Ann. 14(2):67-80.
- [6] WO2004/019977.
- [7] Hozbor y col. (1999) Curr Microbiol 38:273-8.
- [8] US-2007/0087017.
- [9] WO02/09643.
- [10] Katial y col. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
- [11] Patente de EE.UU. 6.180.111.
- [12] WO01/34642.
- [13] WO02/062378.

- [14] WO2004/019977.
- [15] Patente europea 0011243.
- [16] Fredriksen y col. (1991) NIPH Ann. 14(2):67-80.
- [17] WO01/91788.
- 5 [18] WO2005/004908.
- [19] WO2004/014417.
- [20] Wickramasinghe y col. (2005) Biotechnol Bioengineer 92:199-208.
- [21] Rouby y col. (2000) Water Res 34:3630-4.
- [22] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20^a edition, ISBN: 0683306472.
- 10 [23] W02006/110603.
- [24] WO90/14837.
- [25] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- [26] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
- [27] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 15 [28] Vaccine Adyuvantes: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [29] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- [30] Hariharan y col. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- 20 [31] US-2007/014805.
- [32] WO95/11700.
- [33] Patente de EE.UU. 6.080.725.
- [34] W02006/113373.
- [35] WO2005/097181.
- 25 [36] US 5.057.540.
- [37] WO96/33739.
- [38] EP-A-0109942.
- [39] WO96/11711.
- [40] WO00/07621.
- 30 [41] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [42] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [43] EP-A-0689454.
- [44] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [45] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- 35 [46] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
- [47] Pajak y col. (2003) Vaccine 21:836-842.
- [48] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.
- [49] WO02/26757.
- [50] WO99/62923.
- 40 [51] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [52] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.
- [53] WO98/40100.
- [54] US 6.207.646.
- [55] US 6.239.116.
- 45 [56] US 6.429.199.
- [57] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
- [58] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- [59] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- [60] WO01/95935.
- 50 [61] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306:948-953.
- [62] Bhagat y col. (2003) BBRC 300:853-861.
- [63] WO03/035836.
- [64] Schellack y col. (2006) Vaccine 24:5461-72.
- [65] Lingnau y col. (2007) Expert Rev Vaccines 6:741-6.
- 55 [66] WO2004/084938.
- [67] WO95/17211.
- [68] WO98/42375.
- [69] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.
- [70] Pizza y col. (2001) Vaccine 19:2534-2541.
- 60 [71] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [72] Schar-ton-Kersten y col. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.
- [73] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.
- [74] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67:209-216.
- [75] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.
- 65 [76] Pine y col. (2002) J Control Release 85:263-270.
- [77] Tebbey y col. (2000) Vaccine 18:2723-34.

- [78] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.
- [79] WO99/40936.
- [80] WO99/44636.
- [81] Singh y col. (2001) J Cont Release 70:267-276.
- 5 [82] WO99/27960.
- [83] US 6.090.406.
- [84] US 5.916.588.
- [85] EP-A-0626169.
- [86] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- 10 [87] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [88] WO99/11241.
- [89] WO94/00153.
- [90] WO98/57659.
- [91] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- 15 [92] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Supplement 30.
- [93] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.
- [94] Geysen y col. (1984) PNAS USA 81:3998-4002.
- [95] Carter (1994) Methods Mol Biol 36:207-23.
- [96] Jameson, BA y col. 1988, CABIOS 4(1):181-186.
- 20 [97] Raddrizzani & Hammer (2000) Brief Bioinform 1(2):179-89.
- [98] Bublil y col. (2007) Proteins 68(1):294-304.
- [99] De Lalla y col. (1999) J. Immunol. 163:1725-29.
- [100] Kwok y col. (2001) Trends Immunol 22:583-88.
- [101] Brusic y col. (1998) Bioinformatics 14(2):121-30
- 25 [102] Meister y col. (1995) Vaccine 13(6):581-91.
- [103] Roberts y col. (1996) AIDS Res Hum Retroviruses 12(7):593-610.
- [104] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) Comput Appl Biosci 9(3):291-7.
- [105] Feller & de la Cruz (1991) Nature 349(6311):720-1.
- [106] Hopp (1993) Peptide Research 6:183-190.
- 30 [107] Welling y col. (1985) FEBS Lett. 188:215-218.
- [108] Davenport y col. (1995) Immunogenetics 42:392-297.
- [109] Chen y col. (2007) Amino Acids 33(3):423-8.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de vesículas bacterianas inmunogénicas, obtenidas por la alteración o vesiculación de la membrana externa de bacterias, a partir de una composición que incluye tanto bacterias completas como las vesículas obtenidas a partir de las mismas, que consiste en: (i) una primera etapa de filtración de flujo tangencial en la que las vesículas se separan de las bacterias basándose en sus diferentes tamaños, pasando las vesículas al filtrado; y (ii) una segunda etapa de filtración de flujo tangencial en la que las proteínas solubles en el filtrado son retiradas de las vesículas y las vesículas son retenidas en el concentrado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera etapa de filtración es una microfiltración en 0,22 µm.
3. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la segunda filtración es una microfiltración en 0,1 µm.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que las bacterias son *Shigella*.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las bacterias son *Salmonella*.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las bacterias son *E. coli*.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las bacterias son *Haemophilus influenzae*.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las bacterias son *Neisseria meningitidis*.
9. Un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica, que comprende (a) purificar vesículas bacterianas inmunogénicas mediante un procedimiento de cualquier reivindicación precedente y (b) formular las vesículas purificadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante inmunológico y/o con uno o más componentes adicionalmente inmunogénicos.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la composición farmacéutica es una vacuna.

FIGURA 1

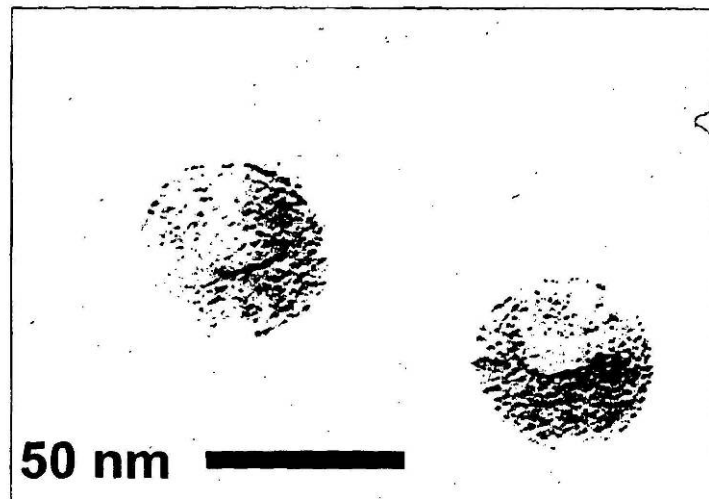


FIGURA 2

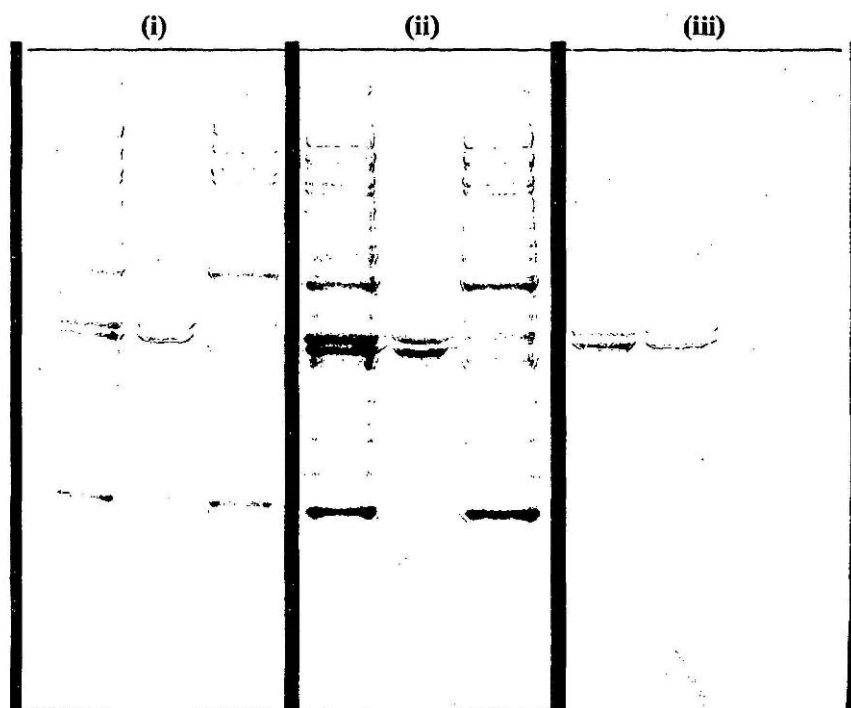


FIGURA 3

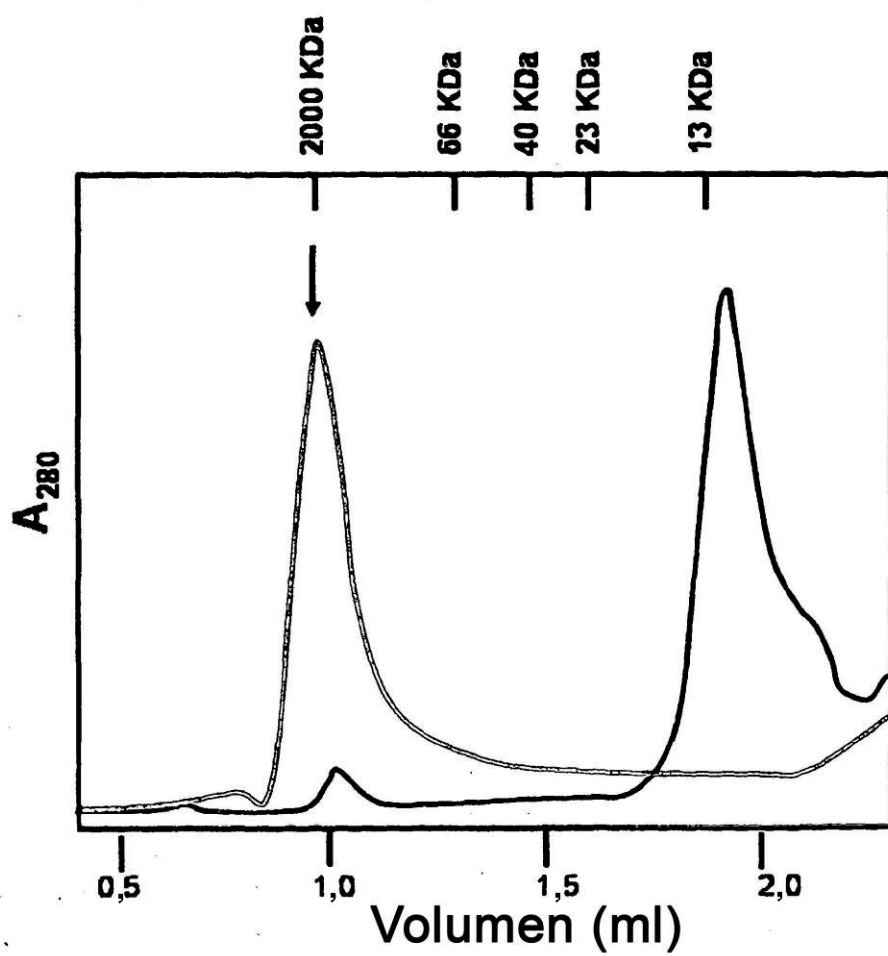


FIGURA 4

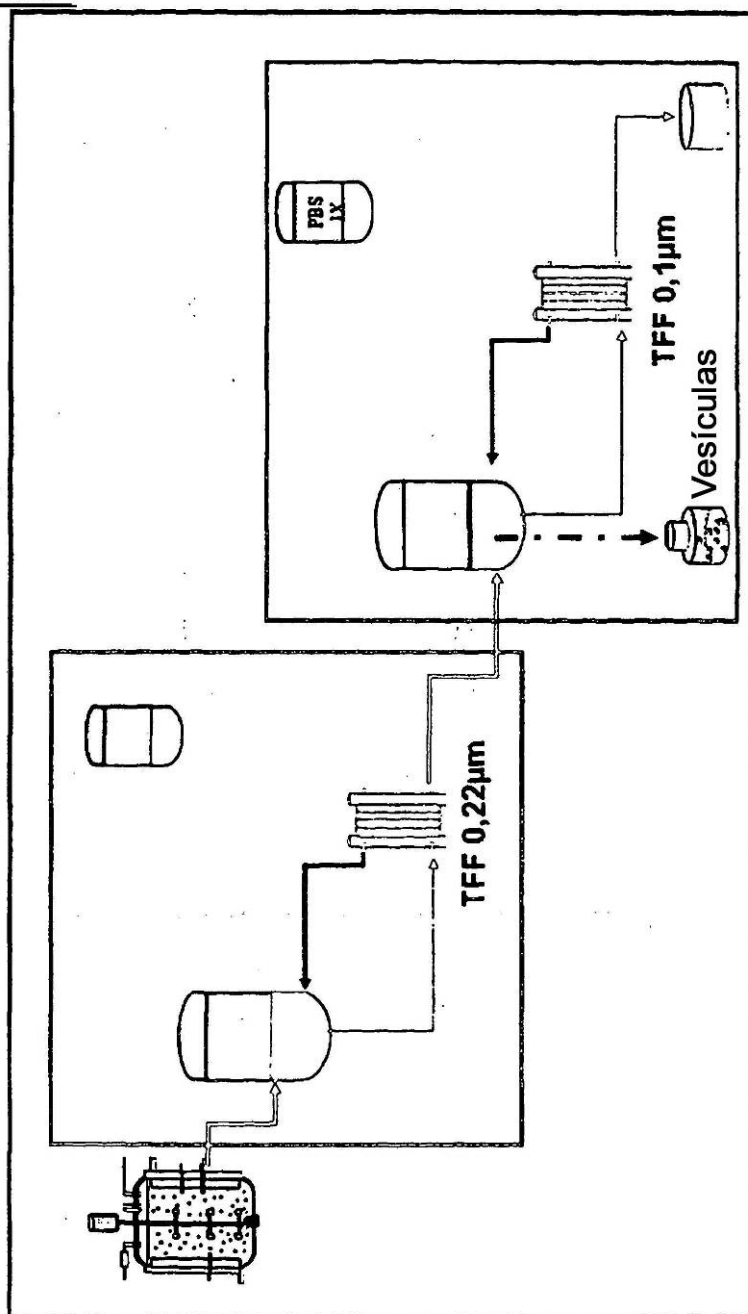


FIGURA 5

