

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 599 908**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/716 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2008 PCT/IB2008/003680**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2009 WO09068996**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08855087 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2224933**

(54) Título: **Glucanos beta-1,3-enlazados conjugados**

(30) Prioridad:

26.11.2007 US 4333 P

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

06.02.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 599 908 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Glucanos beta-1,3-enlazados conjugados

Campo técnico

La invención se refiere a vacunas, más en concreto a vacunas contra enfermedades e infecciones fúngicas, según 5 se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

Las infecciones fúngicas están muy extendidas en varios escenarios clínicos, en particular en pacientes inmunocomprometidos. El surgimiento de una resistencia a antimicóticos, en particular a los azoles, ha aumentado el interés en la vacunación terapéutica y profiláctica contra estos hongos [1]. Entre los patógenos fúngicos, *Candida albicans* es uno de los más extendidos. Este organismo es uno de los principales agentes de infecciones oportunistas ampliamente extendidas en seres humanos y provoca la candidiasis, un trastorno que se encuentra en pacientes normales e inmunocomprometidos. Ha habido varios intentos de proporcionar vacunas anti-*Candida*. Los glucanos son polisacáridos que contienen glucosa que se encuentran, entre otros sitios, en las paredes celulares fúngicas. Los α-glucanos incluyen uno o más α-enlaces entre subunidades de glucosa, y los β-glucanos incluyen uno o más β-enlaces entre las subunidades de glucosa. Dentro de una pared celular fúngica típica, las microfibrillas de β-1,3-glucano están entrelazadas y reticuladas con microfibrillas de quitina para formar la capa esquelética interna, mientras que la capa externa consiste en β-1,6-glucanos y manoproteínas, unidas a la pared interna por medio de quitina y β-1,3-glucano.

En *C. albicans*, 50-70% de la pared celular está compuesta de β-1,3- y β-1,6-glucanos. El uso de los β-glucanos como vacunas antifúngicas se indica en la referencia 2. Se han generado anticuerpos protectores contra el β-1,6-glucano de *C. albicans* en ratones [3, 4]. Los ratones en los que se generaron anticuerpos de β-1,6-glucano mediante vacunación con células de *C. albicans* con menor contenido en manoproteínas han demostrado ejercer algo de protección frente a la exposición sistémica con *C. albicans*. Además, ratones inmunizados de forma pasiva con estos anticuerpos de β-1,6-glucano han mostrado un nivel mayor de protección contra *C. albicans*. De modo similar, se ha descubierto que los anticuerpos anti-β-1,3-glucano protegen frente a *C. albicans*, y los anticuerpos monoclonales que se unen los β-1,3-glucanos pueden proteger frente a la candidiasis experimental diseminada [5].

Un objeto de la invención es proporcionar más y mejores antígenos de glucano para inducir respuestas inmunológicas protectoras y/o terapéuticas contra infecciones, en particular contra infecciones fúngicas.

Torosantucci *et al.* (2005), Journal of Experimental Medicine, 202(5):597-606, describen un conjugado de laminarina-CRM197 que se demostró que era inmunogénico y protector como vacuna inmunoprofiláctica contra infecciones sistémicas y mucosales (vaginales) por *Candida albicans*.

Sumario de la invención

La invención proporciona un conjugado que comprende un glucano unido a una molécula portadora para su uso para prevenir o tratar una infección microbiana en un mamífero mediante el empleo del glucano como inmunógeno 35 para proporcionar una respuesta de anticuerpos protectora, en el que el glucano está formado exclusivamente por restos glucosa β-1,3-enlazados, y en el que la molécula portadora es una toxina bacteriana, un toxoide de la toxina de la difteria, un toxoide de la toxina del tétanos, o CRM197.

Otras características de la invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a un conjugado que comprende un glucano unido a una molécula portadora para su uso según la reivindicación 1. Los glucanos de la invención están compuestos exclusivamente por restos glucosa β-1,3-enlazados. En algunas realizaciones, existen una o más secuencias de al menos cinco restos no terminales adyacentes unidos a otros restos solo a través de enlaces β-1,3. En una realización, el glucano es β-D-glucopiranosa lineal con solo exclusivamente enlaces 1,3. El glucano puede ser un curdlano, un paramilo, o sus fragmentos. El glucano puede ser un fragmento de la hidrólisis del curdlano. En ciertas realizaciones, el glucano contiene de 2-60 unidades de monosacárido de glucosa. El glucano puede utilizarse como inmunógeno. En particular, el glucano puede utilizarse para proporcionar una respuesta de anticuerpos protectora, por ejemplo, contra *C. albicans*.

La presente invención también se refiere a conjugados que presentan un glucano unido a una molécula portadora. La molécula portadora es una toxina bacteriana, un toxoide de la toxina de la difteria, un toxoide de la toxina del tétanos, o CRM197. En una realización particular, el portador es CRM197.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de la invención en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere además a procedimientos para generar una respuesta inmunológica en un mamífero, que comprende administrar un conjugado o una composición farmacéutica de la invención al mamífero.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra una SDS-PAGE de sacáridos y conjugados. Los carriles son: (1) CRM197; (2) laminarina conjugada con CRM197; (3) curdlano hidrolizado conjugado con CRM197; (4) monómero del toxoide del tétanos, Tt; (5) laminarina conjugada con Tt; (6) curdlano hidrolizado conjugado con Tt.

10 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 portador no conjugado. El pico más pequeño es un conjugado de curdlano. El tercer pico es un conjugado de laminarina.

La figura 3 resume la conjugación de glucanos sintéticos.

La figura 4 muestra un análisis de SDS-PAGE de conjugados de glucanos sintéticos.

15 La figura 5 muestra el GMT de IgG contra laminarina conjugada con CRM197 o con el toxoide del tétanos combinada con diversos adyuvantes individuales y combinados administrados mediante administración intraperitoneal.

La figura 6 muestra el GMT de IgG contra laminarina conjugada con CRM197 o con el toxoide del tétanos combinada con diversos adyuvantes individuales y combinados administrados mediante administración subcutánea.

20 La figura 7 muestra el GMT de IgG contra curdlano conjugado con CRM197 o con el toxoide del tétanos combinado con diversos adyuvantes individuales y combinados administrados mediante administración intraperitoneal.

La figura 8 muestra el GMT de IgG contra curdlano conjugado con CRM197 o con el toxoide del tétanos combinado con diversos adyuvantes individuales y combinados administrados mediante administración subcutánea.

La figura 9 muestra el GMT de IgG contra conjugados de laminarina a diversas dosis de sacárido.

25 La figura 10 muestra el GMT de IgG contra conjugados de curdlano solos o combinados con adyuvantes individuales a diversas dosis de sacárido.

La figura 11 muestra el GMT de IgG (anti-GGZym y antilaminarina) contra conjugados de laminarina solos o combinados con adyuvantes individuales a diversas dosis de sacárido.

30 La figura 12 muestra el GMT de IgG (antilaminarina) contra conjugados de laminarina y glucano sintético solos o combinados con diversos adyuvantes individuales y combinados administrados mediante administración intraperitoneal.

La figura 13 muestra la tasa de supervivencia de ratones tratados con laminarina conjugada con CRM197 combinada con MF59 o CRM197 y MF59 solo antes de la exposición a *C. albicans*.

35 La figura 14 muestra la tasa de supervivencia de ratones tratados con curdlano conjugado con CRM197 combinado con MF59 o MF59 solo antes de la exposición a *C. albicans*.

La figura 15 muestra la tasa de supervivencia de ratones tratados con dos conjugados de glucanos sintéticos combinados con MF59 o MF59 solo antes de la exposición a *C. albicans*.

Descripción detallada de la invención

40 Los β -glucanos disponibles en el mercado empleados en las referencias 3 y 5 fueron laminarina y pustulano. Las laminarininas se encuentran en algas y algas marrones y son β -1,3 glucanos con algunas ramificaciones β -1,6. La proporción de β (1-3): β (1-6) varía entre diferentes fuentes, por ejemplo, puede ser tan baja como 3:2 en la laminarina de *Eisenia bicyclis*, pero tan alta como 7:1 en la laminarina de *Laminaria digititata* [6]. El pustulano es un glucano β -1,6-enlazado lineal no fúngico procedente de *Umbilicaria papulosa*. Otros glucanos, tales como escleroglucano (*Sclerotinia sclerotiorum*) y esquizofilano, tienen una proporción de β (1-3): β (1-6) de 3:1 (véase la tabla 2 de la referencia 7). Otros β -glucanos mixtos naturales incluyen lentinano y sonifilano.

Según la invención, los glucanos que presentan exclusivamente enlaces β -1,3 se emplean como inmunógenos. Los inventores han descubierto que estos glucanos pueden ser más inmunogénicos que los glucanos que comprenden

otros enlaces, en particular los glucanos que comprenden enlaces β -1,3 y una mayor proporción de enlaces β -1,6. Los glucanos de la invención comprenden restos glucosa β -1,3-enlazados. En algunas realizaciones, existen una o más secuencias de al menos cinco restos no terminales adyacentes unidos a otros restos solo a través de enlaces β -1,3. Los inventores han descubierto que la presencia de cinco restos no terminales adyacentes unidos a otros restos solo a través de enlaces β -1,3 pueden proporcionar una respuesta de anticuerpos protectora, por ejemplo, contra *C. albicans*. Los glucanos habitualmente se emplean en forma conjugada.

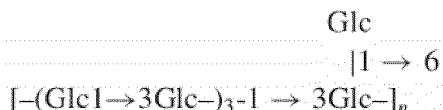
Los glucanos preferidos son β -D-glucopiranosas lineales que presentan exclusivamente enlaces 1,3.

El glucano

La invención emplea glucanos que presentan exclusivamente enlaces β -1,3 entre los restos de D-glucosa. Son preferiblemente lineales.

Así, el glucano puede estar formado solamente por restos glucosa β -1,3-enlazados. En algunas realizaciones, existen una o más (por ejemplo, ≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 , ≥ 7 , ≥ 8 , ≥ 9 , ≥ 10 , ≥ 11 , ≥ 12 , etc.) secuencias de al menos cinco (por ejemplo, ≥ 5 , ≥ 6 , ≥ 7 , ≥ 8 , ≥ 9 , ≥ 10 , ≥ 11 , ≥ 12 , ≥ 13 , ≥ 14 , ≥ 15 , ≥ 16 , ≥ 17 , ≥ 18 , ≥ 19 , ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 60 , etc.) restos no terminales adyacentes unidos a otros restos solo a través de enlaces β -1,3. "No terminal" significa que el resto no está presente en el extremo libre del glucano. En algunas realizaciones, los restos no terminales adyacentes pueden no incluir restos acoplados a una molécula portadora, conector o espaciador, tal como se describe a continuación.

Por contraste, la proporción de glucosa β -1,3-enlazada a glucosa β -1,6-enlazada en una laminarina procedente de *L. digitata* es de 7:1, puesto que su estructura repetida es la siguiente:



20

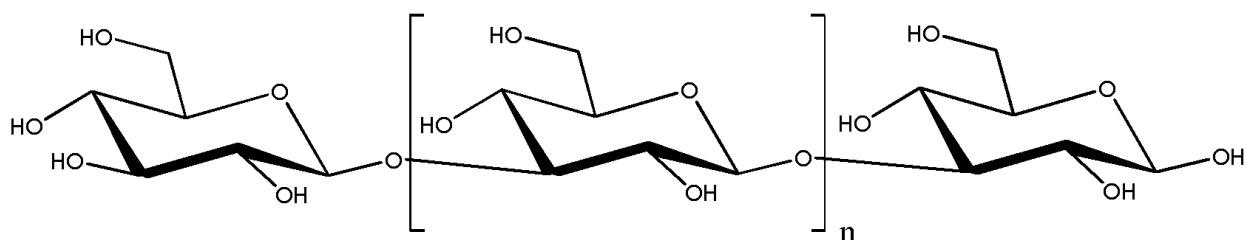
En la naturaleza puede encontrarse un β -1,3/ β -1,6-glucano mixto con la proporción y/o secuencia especificada, o puede ser preparado de modo artificial. Por ejemplo, puede prepararse mediante síntesis química, por completo o en parte. Los procedimientos para la síntesis química de β -1,3/ β -1,6-glucanos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, en las referencias 8-18. También pueden prepararse P-1,3/ β -1,6-glucanos mixtos con la proporción especificada y una secuencia opcional comenzando a partir de la laminarina de *L. digitata* mostrada anteriormente (que tiene una proporción de 7:1) tratándola con una β -1,6-glucanasa (también conocida como glucano endo-1,6- β -glucosidasa, 1,6- β -D-glucano glucanohidrolasa, etc.; EC 3.2.1.75) hasta que se alcance una proporción y/o secuencia deseados.

Cuando se desea un glucano que solo contenga glucosa β -1,3-enlazada, este proceso puede realizarse hasta que se complete, puesto que la β -1,6-glucanasa finalmente producirá β -1,3-glucano puro. Sin embargo, de modo más conveniente, puede utilizarse un β -1,3-glucano puro. Estos pueden prepararse de modo sintético, o mediante síntesis química y/o enzimática, por ejemplo, utilizando una (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano sintasa, de la cual se conocen varias procedentes de muchos organismos (que incluyen bacterias, levaduras, plantas y hongos). Los procedimientos para la síntesis química de β -1,3-glucanos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, en las referencias 19-22. Como una alternativa útil a la síntesis, puede emplearse un β -1,3-glucano natural, tal como un curdlano (β -1,3-glucano lineal, procedente de un *Agrobacterium* previamente conocido como *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*; disponible en el mercado, por ejemplo, en Sigma-Aldrich, n.^o de catálogo C7821) o paramilo (β -1,3-glucano, de *Euglena*). Los organismos que producen niveles elevados de β -1,3-glucanos son conocidos en la técnica, por ejemplo, los *Agrobacterium* de las referencias 23 y 24, o la *Euglena gracilis* de la referencia 25.

40 Una fuente preferida de glucanos β -1,3-enlazados para su uso con la invención es el curdlano. El curdlano se obtiene generalmente con un peso molecular de al menos 100 kDa y un DP (grado de polimerización) de al menos aproximadamente 450 unidades. Forma una hélice de seis plegamientos dextrógira triple en fase paralela que es insoluble en agua. Por tanto, en su forma natural, el curdlano no resulta muy adecuado para la inmunización. Así, la invención puede utilizar un hidrolizado del curdlano. La hidrólisis ácida del curdlano puede romper su esqueleto para reducir su peso molecular promedio de modo que se convierte en soluble y puede someterse a manipulación química y física. De modo ideal, la invención utiliza un hidrolizado del curdlano con un peso molecular promedio en los intervalos que aparecen a continuación. En lugar de emplear la hidrólisis, puede utilizarse una digestión enzimática, por ejemplo, con una glucanasa, tal como una β -1,3-glucanasa. La digestión puede avanzar hasta que el curdlano tenga un peso molecular promedio en los intervalos que aparecen a continuación.

45

Aunque los curdlanos naturales tienen unos pesos moleculares muy altos, los glucanos empleados con la invención tienen unos pesos moleculares más bajos para mejorar la solubilidad en medios acuosos, en particular los que contienen 60 o menos unidades de monosacárido (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 emplearse un glucano con un número de monosacáridos de glucosa en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 20-40 unidades de glucosa. Un glucano con 25-30 unidades de monosacárido de glucosa es particularmente útil. Un glucano con 11-19, por ejemplo, 13-17, y en particular 15 unidades de monosacárido de glucosa también es útil. Por consiguiente, un glucano con la siguiente estructura se contempla específicamente para su uso en la presente invención:



10

en la que $n+2$ está en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 20-40. Preferiblemente, $n+2$ está en el intervalo de 25-30 o 11-19, por ejemplo, 13-17. Los inventores han descubierto que $n+2 = 15$ resulta adecuado.

15

La unión del antígeno de glucano al portador se realiza preferiblemente a través de un grupo -NH₂, por ejemplo, en la cadena lateral de un resto lisina en una proteína portadora, o de un resto arginina. Cuando un glucano presenta un grupo aldehído libre, este puede reaccionar con una amina en el portador para formar un conjugado mediante aminación reductora. La unión al portador también puede realizarse a través de un grupo -SH, por ejemplo, en la cadena lateral de un resto cisteína. Como alternativa, el antígeno de glucano puede unirse al portador a través de una molécula conectora.

El glucano generalmente se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede incluir, por ejemplo, reactivos de cianilación, tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio [37, 38, etc.]). Otras técnicas adecuadas emplean carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU (véase también la introducción a la referencia 33).

Los enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del glucano, seguido por una aminación reductora con la proteína, según se describe, por ejemplo, en las referencias 39 y 40.

Los enlaces a través de un grupo conector pueden realizarse empleando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 41 y 42. Generalmente, el conector se une a través del carbono anomérico del glucano. Un tipo preferido de enlace es un conector de ácido adípico, que puede formarse acoplando un grupo -NH₂ libre (por ejemplo, introducido en un glucano mediante aminación) con ácido adípico (empleando, por ejemplo, activación de diimidato), y después acoplando una proteína al intermedio de sacárido-ácido adípico resultante [31, 43, 44]. Un tipo de enlace preferido similar es un conector de ácido glutárico, que puede formarse acoplando un grupo -NH₂ libre con ácido glutárico de la misma forma. Los conectores de ácido adípico y glutárico también puede formarse mediante acoplamiento directo con el glucano, es decir, sin la introducción anterior de un grupo libre, por ejemplo, un grupo -NH₂ libre, en el glucano, seguido del acoplamiento de la proteína a un intermedio de sacárido-ácido adípico/glutárico resultante. Otro tipo preferido de enlace es un conector de carbonilo, que puede formarse mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre de un glucano modificado con CDI [45, 46], seguido de la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otros conectores incluyen β-propionamido [47], nitrofeniletilamina [48], haluros de haloacilo [49], enlaces glicosídicos [50], ácido 6-aminocaproico [51], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [52], dihidrazida del ácido adípico ADH [53], restos C₄ a C₁₂ [54], etc. También puede utilizarse la condensación de carbodiimida [55].

Puede emplearse un conector bifuncional para proporcionar un primer grupo para el acoplamiento con un grupo amina en el glucano (por ejemplo, introducido en el glucano mediante aminación) y un segundo grupo para el acoplamiento con un portador (generalmente para el acoplamiento con una amina en el portador). Como alternativa, el primer grupo es capaz de acoplarse directamente al glucano, es decir, sin la introducción anterior de un grupo libre, por ejemplo, un grupo amina, en el glucano.

En algunas realizaciones, el primer grupo en el conector bifuncional es capaz, por tanto, de reaccionar con un grupo amina (-NH₂) en el glucano. Esta reacción generalmente implica una sustitución electrófila del hidrógeno de la amina. En otras realizaciones, el primer grupo en el conector bifuncional es capaz de reaccionar directamente con el glucano. En ambos conjuntos de realizaciones, el segundo grupo en el conector bifuncional es capaz, generalmente, de reaccionar con un grupo amina en el portador. Esta reacción, de nuevo, generalmente implica una sustitución electrófila de la amina.

Cuando las reacciones del glucano y del portador implican a aminas, entonces se prefiere emplear un conector bifuncional. Por ejemplo, puede emplearse un conector homobifuncional de fórmula X-L-X, en la que: los dos grupos X son iguales entre sí y pueden reaccionar con las aminas; y en la que L es un resto conector en el conector. De modo similar, puede emplearse un conector heterobifuncional de fórmula X-L-X, en la que: los dos grupos X son diferentes y puede reaccionar con las aminas; y en la que L es un resto conector en el conector. Un grupo X preferido es N-oxisuccinimida. L preferiblemente tiene la fórmula L'-L²-L', en la que L' es carbonilo. Los grupos L' preferidos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀), por ejemplo, -(CH₂)₄- o -(CH₂)₃-.

De modo similar, cuando la reacción del glucano implica el acoplamiento directo, y la reacción con el portador implica a una amina, entonces también se prefiere emplear un conector bifuncional. Por ejemplo, puede emplearse un conector homobifuncional de fórmula X-L-X, en la que: los dos grupos X son iguales entre sí y pueden reaccionar con el glucano/amina; y en la que L es un resto conector en el conector. De modo similar, puede emplearse un conector heterobifuncional de fórmula X-L-X, en la que: los dos grupos X son diferentes y uno puede reaccionar con el glucano mientras que el otro puede reaccionar con la amina; y en la que L es un resto conector en el conector. Un grupo X preferido es N-oxisuccinimida. L preferiblemente tiene la fórmula L'-L²-L', en la que L' es carbonilo. Los grupos L² preferidos son alquilos de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀), por ejemplo, -(CH₂)₄- o -(CH₂)₃-.

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

5 Otros conectores bifuncionales para su uso con la invención incluyen haluros de acriloilo (por ejemplo, cloruro) y haluros de haloacilo.

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

10 Las proteínas portadoras son toxinas bacterianas, tales como toxinas de la difteria o el tétanos, o sus toxoides o mutantes. Estas se emplean habitualmente en vacunas de conjugados. El mutante de la toxina de la difteria CRM₁₉₇ es particularmente preferido [56].

15 Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen el complejo de proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis* [57], péptidos sintéticos [58, 59], proteínas de choque tóxico [60, 61], proteínas de pertussis [62, 63], citoquinas [64], linfoquinas [64], hormonas [64], factores del crecimiento [64], proteínas artificiales que comprenden múltiples epitopos de células T CD4+ humanas procedentes de diversos抗原s derivados de patógenos [65], tales como N19 [66], proteína D de *H. influenzae* [67-69], pneumolisina [70] o sus derivados no tóxicos [71], proteína de la superficie pneumocócica PspA [72], proteínas de captación de hierro [73], toxina A o B de *C. difficile* [74], exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (rEPA) [75], etc. Es posible emplear mezclas de proteínas portadoras. Una única proteína portadora puede portar múltiples glucanos diferentes [76].

20 Los conjugados pueden tener un exceso de portador (en p/p) o un exceso de glucano (en p/p), por ejemplo, en un intervalo de proporción de 1:5 a 5:1. Los conjugados con un exceso de proteína portadora se encuentran en el intervalo típico, por ejemplo, de 0,2:1 a 0,9:1, o pesos equivalentes. El conjugado puede incluir pequeñas cantidades de portador libre (es decir, no conjugado). Cuando una proteína portadora concreta está presente en forma libre y conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada preferiblemente no está en una cantidad mayor que 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferiblemente está presente en menos del 2% (en peso).

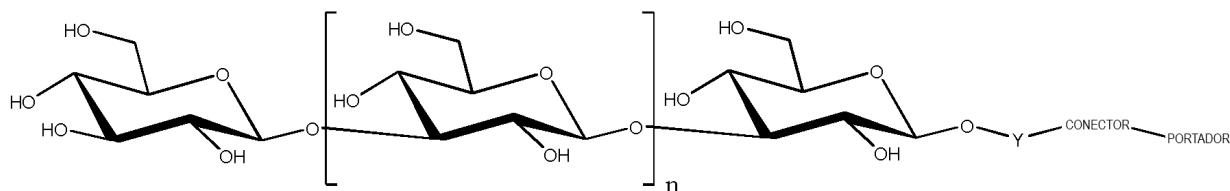
25 Cuando el conjugado forma el componente de glucano en una composición inmunogénica de la invención, la composición también puede comprender la proteína portadora libre como inmunógeno [77].

Después de la conjugación, los glucanos libres y conjugados pueden separarse. Existen muchos procedimientos adecuados, por ejemplo, cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las 30 referencias 78, 79, etc.]. Se prefiere la ultrafiltración de flujo tangencial.

El resto glucano en el conjugado es preferiblemente un glucano de bajo peso molecular o un oligosacárido, tal como se definió anteriormente. Generalmente, se elige el tamaño de los oligosacáridos antes de la conjugación.

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

35 Los inventores han encontrado que la inmunogenicidad puede mejorarse si existe un espaciador entre el glucano y la proteína portadora. En este contexto, un "espaciador" es un resto que es más largo que un único enlace covalente. Este espaciador puede ser un conector, tal como se describió anteriormente. Como alternativa, puede ser un resto unido covalentemente entre el glucano y un conector. Generalmente, el resto se unirá covalentemente al glucano antes del acoplamiento al conector o portador. Por ejemplo, el espaciador puede ser un resto Y, en el que Y comprende una cadena de alquilo lineal de 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀), generalmente de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆). Los inventores han descubierto que una cadena de alquilo lineal con 6 átomos de carbono (es decir, -(CH₂)₆) es particularmente adecuada y puede proporcionar mayor inmunogenicidad que las cadenas más cortas (por ejemplo, -(CH₂)₂). Generalmente, Y se une 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 unido al conector por medio de cualquier enlace adecuado. Generalmente, Y termina con un grupo amina para facilitar la unión a un conector bifuncional, tal como se describió anteriormente. En estas realizaciones, por tanto, Y está unido al conector a través de un enlace -NH-. Por consiguiente, se considera específicamente un conjugado con la siguiente estructura para su uso en la presente invención:



en la que $n+2$ está en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 20-40. Preferiblemente, $n+2$ está en el intervalo de 25-30 o 11-19, por ejemplo, 13-17. Los inventores han descubierto que $n+2 = 15$ resulta adecuado. Y es como se describió anteriormente. "CONECTOR" es un conector opcional, tal como se describió anteriormente, y "PORTADOR" es una molécula portadora, tal como se describió anteriormente.

5

Composiciones farmacéuticas

En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende (a) un conjugado de la invención, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un análisis exhaustivo de estos vehículos está disponible en la referencia 80.

10 Las infecciones microbianas afectan a diversas áreas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, como disoluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o la suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La composición puede prepararse para la administración tópica, por ejemplo, como un ungüento, una crema o un polvo. La composición puede prepararse para la administración oral, por ejemplo, como un comprimido o una cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, empleando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un supositorio o un pesario. La composición puede prepararse para la administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como gotas, como un pulverizado o como un polvo [por ejemplo, 81]. La composición puede incluirse en un colutorio. La composición puede liofilizarse.

15

20

La composición farmacéutica es preferiblemente estéril. Es preferiblemente apirógena. Preferiblemente está tamponada, por ejemplo, a un pH entre 6 y 8, en general a aproximadamente pH 7.

La divulgación también proporciona un dispositivo de administración que contiene una composición farmacéutica según se describe en la presente. El dispositivo puede ser, por ejemplo, una jeringa o un inhalador.

25 Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente composiciones inmunogénicas, puesto que comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de un inmunógeno de glucano. Una 'cantidad inmunológicamente eficaz' significa que la administración de esa cantidad a un individuo, como una dosis individual o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y de la condición física del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunológico del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación que realice el médico encargado de la situación médica y otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad esté en un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado mediante ensayos habituales. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis (por ejemplo, que incluya dosis de recuerdo). La composición puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

30

35

Tras haber sido formuladas, las composiciones pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos.

40 Las composiciones inmunogénicas pueden emplearse de modo terapéutico (es decir, para tratar una infección existente) o profiláctico (es decir, para prevenir una infección futura). La inmunización terapéutica es particularmente útil para tratar una infección por *Candida* en sujetos inmunocomprometidos.

Aunque los propios β -glucanos han sido indicados como adyuvantes, una composición inmunogénica puede incluir otro adyuvante, que puede actuar para potenciar las respuestas inmunológicas (humoral y/o celular) suscitadas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes que pueden emplearse con la invención incluyen, pero no se limitan a:

45 • Una composición que contiene un mineral, que incluye sales de calcio y sales de aluminio (o sus mezclas). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas de "CAP" descritas en la referencia 82). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., y las sales pueden tomar cualquier forma adecuada

(por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [83]. Pueden emplearse los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se emplean solo por conveniencia, puesto que ninguno de ellos son una divulgación precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 166). La invención puede emplear cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se emplean en general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son generalmente sales de oxihidróxido de aluminio, que son habitualmente al menos parcialmente cristalinas. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son generalmente sales de hidroxifosfatos de aluminio, y a menudo contienen también una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato hidroxifosfato de aluminio). Pueden obtenerse mediante precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo en la sal. La invención puede emplear una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En este caso puede contener más fosfato de aluminio que hidróxido de aluminio, por ejemplo, una proporción en peso de al menos 2:1, por ejemplo, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc. La concentración de Al⁺⁺⁺ en una composición para la administración a un paciente es preferiblemente menor que 10 mg/ml, por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido es entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg/dosis.

• Saponinas [capítulo 22 de la referencia 166], que es un grupo heterólogo de glicósidos de esterol y glicósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se ha estudiado a fondo como adyuvante. La saponina también puede obtenerse en el mercado a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officinalis* (hierba jabonera). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™. Las composiciones de saponina se han purificado empleando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado las fracciones purificadas específicas empleando estas técnicas, que

incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Se describe un procedimiento de producción de QS21 en la referencia 84. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [85]. Las combinaciones de saponinas y colesteroles pueden emplearse para formar partículas exclusivas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 166]. Los ISCOM generalmente también incluyen un fosfolípido, tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOM puede utilizarse cualquier saponina conocida. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM también se describen en las referencias 85-87. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar exentos de detergentes adicionales [88]. Puede encontrarse un análisis del desarrollo de adyuvantes con una base de saponinas en las referencias 89 y 90.

• Toxinas ribosilantes de ADP bacterianas (por ejemplo, la enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT", la toxina del cólera "CT", o la toxina de pertussis "PT") y sus derivados desintoxicados, tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 [91]. El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes mucosicos se describe en la referencia 92, y como adyuvantes parenterales en la referencia 93.

• Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado [94] o quitosano y sus derivados [95].

• Micropartículas (es decir, partículas de un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150 μm , más preferiblemente de un diámetro de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 nm, o de un diámetro de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10 μm) formadas de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α -hidroxiácido), un poli(ácido hidroxibutírico), un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), siendo preferido un poli(lactida-co-glicólido), opcionalmente tratado para que tenga una superficie cargada negativamente (por ejemplo, SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

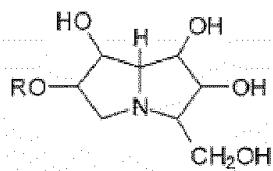
• Liposomas (capítulos 13 y 14 de la referencia 166). Se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes en las referencias 96-98.

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

• Un polímero de polioxidonio [99,100] u otro derivado de polietilenpiperazina N-oxidado.

• Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [101].

- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado [102], tal como un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos lineales o ramificados, no sustituidos o sustituidos, saturados o insaturados de acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo, o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranosa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

- Un ligando de CD1d, tal como una α -glicosilceramida [103-110] (por ejemplo, α -galactosilceramida), α -glicosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecantriol], CRONY-101, 3"-O-sulfogalactosilceramida, etc.

- 5 10 • Una gamma inulina [111] o sus derivados, tales como algamulina.

• Una emulsión de aceite en agua. Se conocen diversas de estas emulsiones, y generalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite o aceites y el tensioactivo o tensioactivos biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión generalmente tienen un diámetro menor que 5 μm e incluso pueden tener un diámetro submicrónico, consiguiéndose estos tamaños tan pequeños con un microfluidificado para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño menor que 220 nm, puesto que pueden someterse a una esterilización con filtro.

- 15 20 25 30 35 40 45 50 • Un oligonucleótido inmunoestimulante, tal como un oligonucleótido que contiene un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene un resto citosina no metilado unido mediante un enlace fosfato a un resto guanosina), o un motivo Cpl (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina unida a una inosina), o un ARN bicatenario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia de polí(dG). Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden incluir análogos/modificaciones de nucleótidos, tales como modificaciones de fosforotioato, y pueden ser bicatenarios o monocatenarios (excepto para el ARN). Las referencias 112, 113 y 114 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, el reemplazo de guanosina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza más a fondo en las referencias 115-120. Una secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTGCGTT [121]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta immunológica de Th1, tal como un CpG-A ODN (oligodesoxinucleótido), o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como CpG-B ODN. Los CpG-A y CpG-B ODN se analizan en las referencias 122-124. Preferiblemente, el CpG es un CpG-A ODN. Preferiblemente, el oligonucleótido de CpG se construye de modo que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias oligonucleotídicas de CpG pueden estar unidas en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, las referencias 121 y 125-127. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otro es CpG1826. Como alternativa, o además, del empleo de las secuencias de CpG, pueden utilizarse secuencias de TpG [128], y estos oligonucleótidos pueden no contener motivos CpG no metilados. El oligonucleótido inmunoestimulante puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, según se describe en la referencia 128) y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% timidina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, según se describe en la referencia 128) y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% de citosina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Estos oligonucleótidos pueden no contener motivos CpG no metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes comprenden generalmente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos. Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimulantes se conoce como IC31™ [129]. Así, un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) que incluye al menos uno (y preferiblemente muchos) motivos Cpl, y (ii) un polímero poliacatiónico, tal como un oligopeptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluye al menos una (y preferiblemente muchas) secuencia o secuencias tripeptídicas Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende una secuencia 26-mera 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO:1). El polímero poliacatiónico puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KLLLLLLKLK (SEQ ID NO:2).

- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3dMPL', también conocido como 'MPL™') [130-133]. En condiciones acuosas, el 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo con un

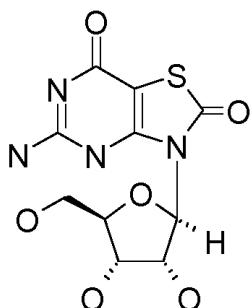
diámetro <150 nm o >500 nm. Cualquiera o ambos pueden utilizarse con la invención, y las mejores partículas pueden seleccionarse mediante un ensayo habitual. Se prefieren las partículas más pequeñas (por ejemplo, lo suficientemente pequeñas como para producir una suspensión acuosa transparente de 3dMPL) para su uso según la invención debido a su mayor actividad [134]. Las partículas preferidas tienen un diámetro promedio menor que 220 nm, más preferiblemente menor que 200 nm o menor que 150 nm o menor que 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro promedio menor que 100 nm. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el diámetro promedio no será menor que 50 nm.

5 • Un compuesto de imidazoquinolina, tal como imiquimod ("R-837") [135,136], resiquimod ("R-848") [137], y sus análogos; y sus sales (por ejemplo, las sales hidrocloruro). Pueden encontrarse más detalles acerca de las imidazoquinolinas inmunoestimulantes en las referencias 138 a 142.

10 • Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los descritos en la referencia 143. Los procedimientos para formular, fabricar y seleccionar compuestos activos también se describen en la referencia 143. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces para la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .

15 • Un compuesto de triptantrina, tal como los descritos en la referencia 144. Los procedimientos para formular, fabricar y seleccionar compuestos activos también se describen en la referencia 144. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces para la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .

• Un análogo de nucleósido, tal como: (a) isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



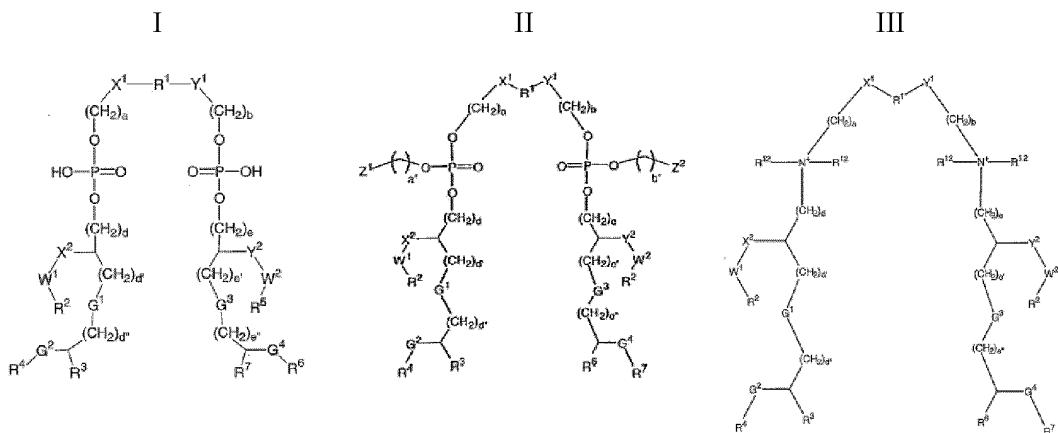
20 y sus profármacos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos descritos en las referencias 145 a 147, loxoribina (7-allil-8-oxoguanosina) [148].

25 • Los compuestos descritos en la referencia 149, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobenzimidazolquinolinona (ABIQ) [150,151], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinazilinona, compuestos de pirrol [152], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina, y compuestos de benzazol [153].

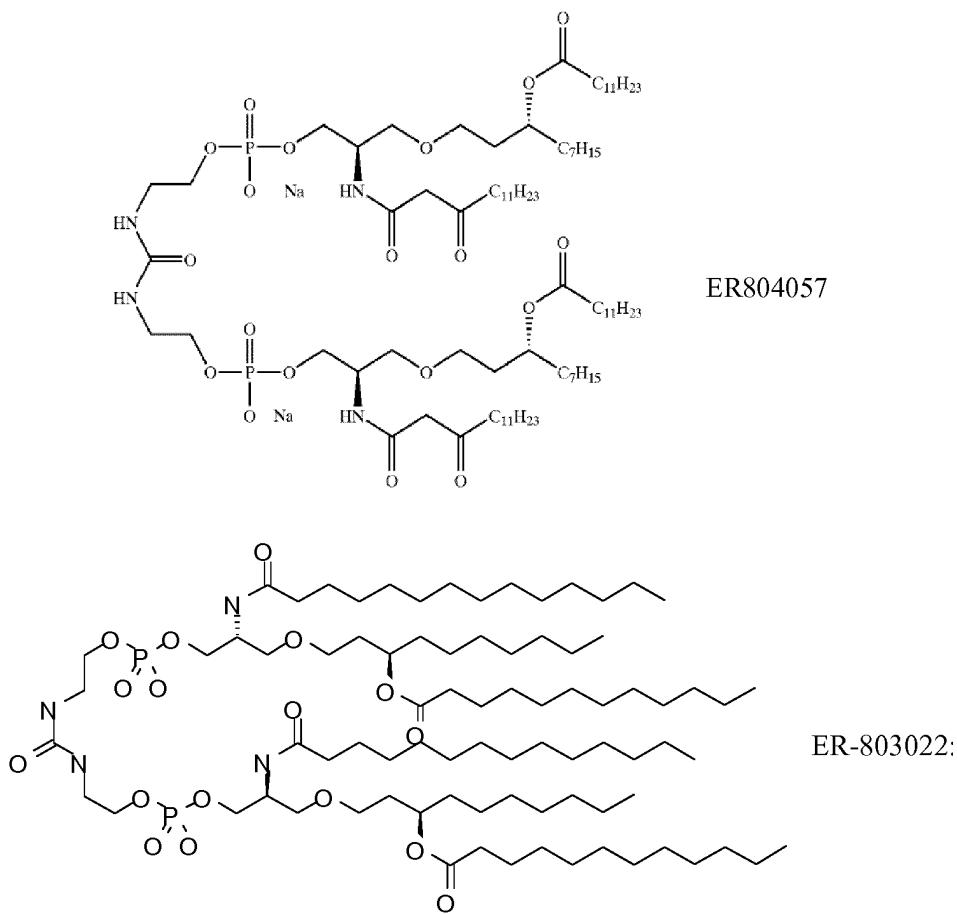
• Un derivado de aminoalquil glucosaminida fosfato, tal como RC-529 [154,155].

30 • Un fosfaceno, tal como poli[di(carboxilatofenoxy)fosfaceno] ("PCPP") tal como se describe, por ejemplo, en las referencias 156 y 157.

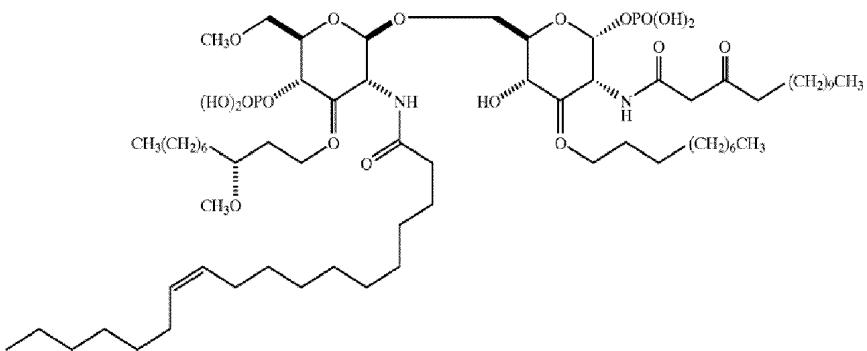
• Una urea sustituida o compuesto de fórmula I, II o III, o una de sus sales:



según se define en la referencia 158, 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:



- Derivados del lípido A procedente de *Escherichia coli*, tal como OM-174 (descritos en las referencias 159 y 160).
- Compuestos que contienen lípidos unidos a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, tales como el antagonista de TLR4 E5564 [161,162]:



Estas y otras sustancias activas como adyuvantes se analizan con más detalle en las referencias 166 y 167.

Los antígenos y los adyuvantes en una composición generalmente estarán mezclados.

Las composiciones pueden incluir dos o más de dicho adyuvantes. Por ejemplo, pueden incluir de forma ventajosa una emulsión de aceite en agua y 3dMPL, etc.

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

• Una emulsión submicrónica de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80, y aproximadamente 0,5% de Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80, y 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [163-165], según se describe con más detalle en el capítulo 10 de la referencia 166 y el capítulo 12 de la referencia 167. La emulsión de MF59 incluye, de modo ventajoso, iones citrato, por ejemplo tampón citrato de sodio 10 mM.

• Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir disolución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden contener del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de tocoferol, y del 0,3 al 3% de Tween 80, y la proporción en peso de escualeno a tocoferol es preferiblemente ≤1, puesto que es la que proporciona una emulsión más estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes a una proporción en volumen de aproximadamente 5:2. Una de estas emulsiones puede prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para obtener una disolución al 2%, después mezclando 90 ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), y después microfluidificando la mezcla. La emulsión resultante puede contener gotas de aceite submicrónicas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.

• Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón fosfato.

• Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una proporción en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, polisorbato 80 750 μ g/ml, Triton X-100 110 μ g/ml, y succinato de α -tocoferol 100 μ g/ml), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes procedente de los antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.

• Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha empleado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [168] (Thr-MDP al 0,05-1%, escualeno al 5%, Pluronic L121 al 2,5%, y polisorbato 80 al 0,2%). También puede emplearse sin Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [169] (escualeno al 5%, Pluronic L121 al 1,25%, y polisorbato 80 al 0,2%). Se prefiere la microfluidificación.

• Una emulsión que contiene del 0,5-50% de un aceite, del 0,1-10% de un fosfolípido, y del 0,05-5% de un tensioactivo no iónico. Tal como se describe en la referencia 170, los componentes de fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanamina, fosfatidilsérina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Unos tamaños de las gotas submicrónicas son ventajosos.

• Una emulsión de aceite en agua submicrónica de un aceite metabolizable (tal como un aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos, tales como Quila

saponina, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 171, producido por la adición de una 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)propandiamina.

- 5 • Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo, un colesterol) están asociados como micelas helicoidales [172].

Tratamientos médicos y usos

La invención proporciona además un conjugado para su uso en medicina, por ejemplo, para su uso para generar una respuesta de anticuerpos en un mamífero.

10 La divulgación también proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmunológica en un mamífero, que comprende administrar un glucano, un conjugado o una composición farmacéutica de la divulgación al mamífero.

La divulgación también proporciona el uso de un glucano o un conjugado de la divulgación para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una infección microbiana en un mamífero.

15 La respuesta inmunológica generada por estos procedimientos y usos en general incluye una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos después de una inmunización con sacáridos son muy conocidos en la técnica. La respuesta de anticuerpos es preferiblemente una respuesta de IgA o IgG. La respuesta inmunológica puede ser profiláctica y/o terapéutica. El mamífero es preferiblemente un ser humano.

20 Debido a que los glucanos (y los β -glucanos en particular) son un constituyente de polisacárido fundamental y principal de casi todos los hongos patógenos, en particular los implicados en infecciones en sujetos inmunocomprometidos, y también en patógenos bacterianos y protozoos, la inmunidad antiglucano puede ser eficaz contra una amplia gama de patógenos y enfermedades. Por ejemplo, un suero antiglucano generado después de una inmunización con *S. cerevisiae* presenta reactividad cruzada con *C. albicans*. La inmunidad de amplio espectro es particularmente útil porque, para estos agentes fúngicos infecciosos humanos, la quimioterapia es escasa, está surgiendo una resistencia a los fármacos antifúngicos y cada vez se reconoce más la necesidad de desarrollar vacunas preventivas y terapéuticas.

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

30 Los usos y procedimientos de la invención son particularmente útiles para prevenir/tratar enfermedades que incluyen, pero no se limitan a: candidiasis (que incluye candidiasis hepatoesplénica, candidiasis invasiva, candidiasis mucocutánea crónica y candidiasis diseminada); candidemia; aspergilosis, criptococosis, dermatomicosis, esporotricosis y otras micosis subcutáneas, blastomicosis, histoplasmosis, coccidiomicosis, paracoccidiomicosis, neumocistosis, afta, tuberculosis, micobacteriosis, infecciones respiratorias, escarlatina, neumonía, impétigo, fiebre reumática, sepsis, septicemia, leishmaniasis cutánea y visceral, acantamebiasis corneal, fibrosis quística, fiebre tifoidea, gastroenteritis y síndrome hemolítico-urémico. La actividad anti-*C. albicans* es particularmente útil para tratar infecciones en pacientes con SIDA.

35 La eficacia del tratamiento terapéutico puede ensayarse mediante el control de la infección microbiana después de la administración de la composición de la invención. La eficacia del tratamiento profiláctico puede ensayarse mediante el control de las respuestas inmunológicas contra β -glucanos (por ejemplo, anticuerpos anti- β -glucanos) después de la administración de la composición.

40 Las composiciones de la divulgación en general se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede realizarse mediante una inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, o hacia el espacio intersticial de un tejido), o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intradérmica, ocular, nasal, aural, o pulmonar. Se prefiere la administración por inyección o intranasal.

La invención puede utilizarse para suscitar una inmunidad sistémica y/o mucósica.

Las vacunas preparadas según la invención pueden utilizarse para tratar niños y adultos. Así, un sujeto puede tener menos de 1 año de edad, de 1-5 años, de 5-15 años, de 15-55 años, o al menos 55 años. Los sujetos preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥50 años, ≥60 años, y preferiblemente ≥65 años), o los infantes (por ejemplo, ≤5 años). Sin embargo, las vacunas son adecuadas no solamente para estos grupos y puede utilizarse de modo más general en una población.

El tratamiento puede realizarse mediante un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis. Pueden emplearse múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de recuerdo. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por medio de la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo, un cebado parenteral y un recuerdo mucoso, un cebado mucoso y un recuerdo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (generalmente dos dosis) es particularmente útil en pacientes sin exposición inmunológica. Las dosis múltiples se administrarán generalmente con un intervalo de una semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

Los conjugados de la divulgación pueden combinarse con antígenos que no son glucanos en una única composición para la inmunización simultánea contra múltiples patógenos. Como alternativa a preparar una vacuna combinada, los conjugados pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) que otras vacunas.

Los antígenos para su uso en estas vacunas de combinación o para la administración concomitante incluyen, por ejemplo, inmunógenos de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y/o *Pseudomonas aeruginosa*, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, *Neisseria meningitidis* (tales como sacáridos o sacáridos conjugados para los serogrupos A, C, W135 y/o Y), *Streptococcus pneumoniae* (tales como sacáridos o sacáridos conjugados), etc.

Las composiciones de la invención pueden emplearse junto con antifúngicos, en particular cuando un paciente ya está infectado. El antifúngico ofrece un efecto terapéutico inmediato, mientras que la composición inmunogénica 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 173]. El antifúngico y la composición inmunogénica pueden administrarse por separado o en combinación. Cuando se administran por separado, generalmente se administrarán con un intervalo de 7 días. Despues de la primera administración de una composición inmunogénica, el antifúngico puede administrarse más de una vez.

Definiciones

El término "comprende" engloba "incluye", así como "consiste", por ejemplo, una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo más, por ejemplo, X + Y.

El término "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, el término "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

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

A menos que se indique lo contrario, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere un orden de mezclado específico. Así, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando existen tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y después la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

Cuando se empleen materiales animales (y en particular bovinos) en el cultivo de células, estos deben obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE), y en particular libres de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE). De modo general, se prefiere cultivar las células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Cuando un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede ser sustituido, de modo alternativo, por un profármaco adecuado.

Modos de realizar la invención

Conjugación del curdlano (1)

Un curdlano con un PM inicial de >100 kDa se trató mediante una hidrólisis ácida empleando HCl (0,5 M) en DMSO

durante 10 minutos a 85 °C. El hidrolizado tiene un DP de aproximadamente 25 unidades.

El material hidrolizado se neutralizó con tampón fosfato de sodio (400 mM, pH 6,8) y se diluyó con agua para obtener una dilución 10:1 del material de partida. La concentración final fue de 1 mg/ml. Después de la dilución puede detectarse algo de precipitación. Los precipitados eran probablemente sacáridos de alto PM.

- 5 Se añadió acetato de amonio y después cianoborohidruro de sodio. Después de ajustar el pH a 7,0, la mezcla se incubó a 37 °C durante 3-5 días. Este tratamiento introduce un grupo amino primario en el extremo terminal reductor de los fragmentos del curdlano. Los aminosacáridos después se purificaron mediante ultrafiltración con una membrana con un límite de exclusión de 3 kDa. Se calcularon los grupos amino mediante el procedimiento de Habeeb.
- 10 El amino-oligosacárido secado se solubilizó en agua destilada a una concentración de grupo amino de 40 mM, después se añadieron 9 volúmenes de DMSO, seguido de trietilamina a una concentración final de 200 mM. A la disolución resultante se le añadió N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adipico para obtener una concentración final de 480 mM. Los grupos éster generados de esta manera se calcularon mediante el análisis de los grupos N-hidroxisuccinimido liberados.
- 15 El oligosacárido activado secado se añadió a CRM₁₉₇ en tampón fosfato 10 mM, pH 7,0. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante la noche. El material final presentaba una proporción de aproximadamente 50:1 en términos de moles de N-hidroxisuccinimido éster por mol de proteína.
- 20 El conjugado después se purificó mediante ultrafiltración con una membrana con un límite de exclusión de 30 kDa. El conjugado se caracterizó mediante SDS-PAGE, SEC-HPLC y RMN. Además se calculó el contenido en sacáridos (sacáridos totales y no conjugados) y en proteínas.

Se prepararon conjugados de la misma forma, pero con el toxoide del tétanos como portador en lugar de CRM197.

Para cinco lotes de conjugados preparados, las proporciones de sacárido:proteína fueron las siguientes (portador en exceso):

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

- 25 La figura 1 muestra una SDS-PAGE de ejemplos de conjugados, y la figura 2 muestra sus perfiles de SEC-HPLC.

Conjugación (2)

- Se prepararon conjugados de curdlano sintético (15-mero) y laminarina (17-mero) según el procedimiento descrito en la figura 3. Brevemente, los oligosacáridos sintéticos indicados se solubilizaron en agua destilada a una concentración de 40 mM de grupos amino. Después se añadieron nueve volúmenes de DMSO, seguido de trietilamina hasta una concentración final de 200 mM. Para el conjugado de 15-mero-C6 β(1-3)-CRM se añadió N-hidroxisuccinimido diéster de glutarato hasta una concentración final de 240 mM. Para los conjugados de 15-mero-C6 β(1-3)-CRM y 17-mero-C6 β(1-3)-CRM se añadió N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adipico hasta una concentración final de 480 mM. Los oligosacáridos activados después se purificaron mediante precipitación con dioxano al 80% en v/v. Se calculó el número de grupos éster generados en cada reacción midiendo la cantidad de grupos N-hidroxisuccinimido liberados. Después se añadieron los oligosacáridos activados y secados a una disolución de CRM197 30 mg/ml en tampón fosfato 10 mM a pH 7,2. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante la noche. Los materiales finales presentaban una proporción de aproximadamente 50:1 en términos de moles de N-hidroxisuccinimido éster por mol de proteína.

- 40 Los conjugados después se caracterizaron mediante SDS-PAGE y SEC-HPLC. Se calculó el contenido en sacáridos y en proteínas como sigue:

Muestra	Conc. sacár. (mg/ml)	Conc. prot. (mg/ml)	Sacár./prot. (% en p/p)	Sacár./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 4 ilustra un análisis de SDS-PAGE de estos conjugados en un gel de Tris-acetato al 7% (20 μ g cargados por pocillo).

Estudio de inmunogenicidad (1)

- 5 Los conjugados de curdlano preparados como se describió en *Conjugación del curdlano* (1) se administraron a ratones en estudios de inmunogenicidad, y se compararon con conjugados de laminarina-CRM197 preparados como se ha descrito en la técnica anterior, por ejemplo, como en las referencias 174 y 175. Se ensayó más de un lote de conjugados de curdlano.
- 10 Ratones CD2F1 de 4-6 semanas de edad se ensayaron en 18 grupos de 10. Los conjugados se emplearon a una dosis de sacárido de 5 μ g en un volumen de dosificación de 150 μ l, y se administraron por vía intraperitoneal en los días 1, 7 y 21. Se obtuvieron muestras de sangre en los días 0, 21 y 35 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym mediante ELISA [3, 4]. 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 μ g de un oligodesoxinucleótido de CpG; (d) una combinación de (b) con un oligodesoxinucleótido de CpG.
- 15 En la tabla 1 se indican los anticuerpos antiglucano (GMT) y el número de los ratones respondedores (%) en el día 35.

Tabla 1

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

- 20 Los conjugados de curdlano en general son más inmunogénicos que los conjugados de laminarina.

Estudio de inmunogenicidad (2)

En otros experimentos, los conjugados de laminarina y curdlano preparados como se describió en *Estudio de inmunogenicidad (1)* también recibieron adyuvantes de α -galactosilceramida (100 ng) o LT-K63 (2 mg), solos o en combinación con otros adyuvantes. El adyuvante de CpG también se ensayó a tres dosis diferentes (0,5 μ g, 5 μ g y 10 μ g). Los detalles fueron los mismos que en el estudio de inmunogenicidad previo, pero con 8 ratones por grupo. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Grupo	Glucano	Adyuvante	GMT	% de respondedores
1	Laminarina	-	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 _{10 μg}	84	775
9		Alumbre + CpG _{5 μg}	407	100
10		Alumbre + CpG _{0,5 μg}	133	71
11	Curdlano	-	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

De nuevo, los conjugados de curdlano en general son más inmunogénicos que los conjugados de laminarina.

10 Estudio de inmunogenicidad (3)

En otros trabajos, la laminarina o el curdlano conjugados con CRM197 o el toxoide del tétanos se combinaron con diversos adyuvantes individuales y combinados, y se administraron a ratones mediante administración subcutánea o intraperitoneal. Los conjugados se prepararon como se describió en *Estudio de inmunogenicidad (1)*.

Ratones CD2F1 de 4-6 semanas de edad se ensayaron en 12 grupos de 10. Los conjugados se emplearon a una dosis de sacárido de 5 μ g en un volumen de dosificación de 150 μ l, y se administraron los días 1, 14 y 28 mediante administración subcutánea o intraperitoneal. Se obtuvieron muestras de sangre en los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym mediante ELISA.

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 μ g); (b) una combinación de (a) y un oligodesoxinucleótido de CpG, CpG1826 (10 μ g); y (c) el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 μ l), respectivamente. Los grupos 4-6 se trataron de la misma manera que los grupos 1-3, respectivamente, excepto que el glucano era curdlano en lugar de laminarina. Los grupos 7-9 se trataron de la misma manera que los grupos 1-3, respectivamente, excepto que la laminarina se conjugó con el toxoide del tétanos en lugar de CRM197. De modo similar, los grupos 10-12 se

trataron de la misma manera que los grupos 4-6, respectivamente, excepto que el curdlano se conjugó con el toxoide del tétanos en lugar de CRM197.

En la figura 5 se muestran los anticuerpos antiglucano (GMT) en el día 42 después de la administración intraperitoneal de los conjugados de laminarina a los ratones. Los correspondientes resultados después de la administración subcutánea se muestran en la figura 6. Los resultados demuestran que se observa en general una mejor respuesta cuando los conjugados se administran mediante administración subcutánea. Además, en general se obtienen mejores resultados empleando CRM197 como la proteína portadora, en particular cuando los conjugados se administran mediante administración subcutánea.

De modo similar, en la figura 7 se muestran los anticuerpos antiglucano (GMT) en el día 42 después de la administración intraperitoneal de los conjugados de curdlano. Los correspondientes resultados después de la administración subcutánea se muestran en la figura 8. Cuando se emplea CRM197 como la proteína portadora se observa una mejor respuesta cuando los conjugados se administran mediante administración subcutánea.

Estudio de inmunogenicidad (4)

En otro estudio, la laminarina o el curdlano conjugados con CRM197 se administran a ratones empleando diferentes dosis de sacárido. Los conjugados se prepararon como se describió en *Estudio de inmunogenicidad (1)*.

Ratones CD2F1 de 4-6 semanas de edad se ensayaron en 12 grupos de 8. Los conjugados se emplearon a una dosis de sacárido de 10 µg, 5 µg, 1 µg o 0,1 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, y se administraron en los días 1, 14 y 28. Se obtuvieron muestras de sangre en los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos anti-GGZym mediante ELISA. También se midieron los niveles de anticuerpos antilaminarina sustituyendo el GG-Zym por laminarina en el ELISA, según se describe en la referencia 175.

El grupo 1 recibe tres dosis idénticas de laminarina conjugada con CRM197 sin adyuvante y una dosis de sacárido de 5 µg. El grupo 2 recibe 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 histidina durante la purificación de los conjugados administrados a estos grupos, tal como se describe en la referencia 176.

Los grupos 7-12 se trataron de la misma manera que los grupos 1-6, excepto que el glucano era curdlano en lugar de laminarina.

En la figura 9 se muestran los anticuerpos antiglucano (GMT) en el día 42 después de la administración de los conjugados de laminarina a diversas dosis de sacárido. Los resultados demuestran que se observa una respuesta en todas las dosis, obteniéndose la mejor respuesta con una dosis de sacárido de 5 µg.

En la figura 10 se muestran los anticuerpos antiglucano (GMT) en el día 42 después de la administración de los conjugados de curdlano. De nuevo, los resultados demuestran que se observa una respuesta en todas las dosis de sacárido. Las mejores respuestas se obtuvieron con unas dosis de sacárido de 10 µg y 5 µg.

En la figura 11 se muestran los anticuerpos antiglucano (GMT) en el día 42 después de la administración de los conjugados de laminarina. Los resultados obtenidos empleando el ELISA de anticuerpos anti-GGZym se compararon con los ELISA del anticuerpo antilaminarina. Se observaron unas titulaciones altas empleando el ELISA de anticuerpos antilaminarina.

Estudio de inmunogenicidad (5)

En otro estudio, los conjugados preparados según se describió en *Conjugación (2)* y laminarina conjugada con CRM197 se combinaron con diversos adyuvantes individuales y combinados, y se administraron a ratones mediante administración intraperitoneal. La laminarina conjugada con CRM197 se preparó como se describió en *Estudio de inmunogenicidad (1)*, excepto por un lote alternativo de laminarina con CRM197 (lote 11AD), que se preparó sin una etapa de aminación antes de la conjugación.

Ratones CD2F1 de 4-6 semanas de edad se ensayaron en 11 grupos de 16. Los conjugados se emplearon a una dosis de sacárido de 5 µg en un volumen de dosificación de 150 µl, y se administraron por vía intraperitoneal en los días 1, 14 y 28. Se obtuvieron muestras de sangre en los días 0, 28 y 42 para evaluar los niveles de anticuerpos antilaminarina mediante ELISA.

Los grupos 1-3 recibieron tres dosis idénticas de a) conjugado de 17-mero-C2 β(1-3)-CRM; b) conjugado de 15-mero-C6 β(1-3)-CRM; o c) conjugado de 15-mero-C2 β(1-3)-CRM, respectivamente, todos sin adyuvante. Los

grupos 4-6 recibieron tres dosis idénticas de a) conjugado de 17-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM; b) conjugado de 15-mero-C6 $\beta(1-3)$ -CRM; o c) conjugado de 15-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM, respectivamente, todos con el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 (75 μ l). 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 μ l), 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 μ l) combinado con IC31 a una dosis alta (49,5 μ l de una muestra que contiene más de oligodesoxinucleótidos 1000 nmol/ml y péptidos 40 nmol/ml); o b) un adyuvante de hidróxido de aluminio (300 μ g), 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 μ l).

En la figura 12 se muestran los anticuerpos antilaminarina (GMT) en el día 42 después de la administración de los conjugados. Los resultados demuestran que los conjugados de curdlano y laminarina sintéticos tienen una inmunogenicidad similar a los otros conjugados. Cuando está presente un adyuvante, la inmunogenicidad puede mejorar empleando una versión sintética del glucano pertinente (compárese la respuesta observada después de la administración de 17-mero-C2 $\beta(1-3)$ -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 mejorar empleando un espaciador más largo entre el glucano y la proteína portadora (compárese la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C6 $\beta(1-3)$ -CRM y 15-mero-C6 $\beta(1-3)$ -CRM/MF59 (barras 2 y 5) con la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM y 15-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM/MF59 (barras 3 y 6)). En ausencia de adyuvante, la inmunogenicidad contra los glucanos sintéticos puede mejorar por la ausencia de ramificaciones β -1,6 (compárese la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM (barra 3) con la respuesta observada después de la administración de 17-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM (barra 1)). Por contraste, en presencia de adyuvante, la inmunogenicidad contra los glucanos sintéticos puede mejorar por la presencia de ramificaciones β -1,6 (compárese la respuesta observada después de la administración de 17-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM/MF59 (barra 4) con la respuesta observada después de la administración de 15-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM/MF59 (barra 6)). Para la laminarina conjugada con CRM197, la omisión de la etapa de aminación antes de la conjugación no evitó la inmunogenicidad (compárense las barras 8 y 11).

Estudio de protección activa (1)

En otro estudio se ensayó la capacidad de los ratones que reciben glucanos conjugados con CRM197 combinados con el adyuvante MF59 para sobrevivir a una exposición a *C. albicans*. Los conjugados se prepararon como se describió en *Estudio de inmunogenicidad (1)*.

Ratones hembra de cuatro semanas de edad CD2F1 (Harlan) fueron inmunizados con tres dosis de laminarina o curdlano conjugado con CRM197, y cada dosis consistió en 10 μ g de polisacárido en 0,2 ml de PBS:MF59 (1:1 en v/v) por ratón.

El programa de inmunización fue:

- Día 0 - primera dosis mediante administración subcutánea
- Día 14 - segunda dosis mediante administración intraperitoneal
- Día 28 - tercera dosis mediante administración intraperitoneal
- Día 35 - sangrado
- Día 40 - exposición fúngica mediante la 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 curdlano) de células de *C. albicans* cepa BP en 0,2 ml de PBS por ratón.

Los puntos finales de protección se midieron en términos de mortalidad (mediana del tiempo de supervivencia (MST) y proporción de ratones expuestos muertos/totales).

La figura 13 muestra la tasa de supervivencia de ratones tratados con laminarina conjugada con CRM197 combinada con MF59 o CRM197 y MF59 solo antes de la exposición a *C. albicans*. La supervivencia más larga de los ratones tratados con el conjugado también se muestra en términos de MST en la tabla 3.

Tabla 3

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

La figura 14 muestra la tasa de supervivencia de ratones tratados con curdlano conjugado con CRM197 combinado con MF59 o MF59 solo antes de la exposición a *C. albicans*. La supervivencia más larga de los ratones tratados con el conjugado también se muestra en términos de MST en la tabla 4.

5

Tabla 4

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

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

Estudio de protección activa (2)

- 10 En un estudio similar se ensayó la capacidad de los ratones que reciben glucanos conjugados con CRM197 combinados con el adyuvante MF59 para sobrevivir a una exposición a *C. albicans*. Los conjugados se prepararon como se describió en *Conjugación (2)*. En este estudio, la exposición fúngica se realizó mediante la administración intravenosa de $5,0 \times 10^5$ células.
- 15 La figura 15 muestra la tasa de supervivencia de 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 solo antes de la exposición a *C. albicans*. La supervivencia más larga de los ratones tratados con el conjugado de 15-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM también se muestra en términos de MST en la tabla 5.

Tabla 5

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

- 20 El tratamiento con 15-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM produjo una mayor supervivencia, mientras que el tratamiento con 17-mero-C2 $\beta(1-3)$ -CRM no pareció tener ningún efecto. Este resultado sugiere que el epitopo responsable de inducir una respuesta de anticuerpos protectora en el glucano comprende al menos cinco restos no terminales adyacentes unidos a otros restos solo a través de enlaces β -1,3. Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, se cree que este efecto puede contribuir a la mayor respuesta de anticuerpos protectora observada en ratones que reciben curdlano conjugado con CRM197 que en ratones que reciben laminarina conjugada con CRM197 en el *Estudio de protección activa (1)*. El curdlano conjugado con CRM197 (en el que el glucano comprende solo restos β -1,3-enlazados) puede contener una mayor proporción de epitopos protectores que la laminarina conjugada con CRM197 (en la que el glucano comprende restos β -1,3-enlazados y restos β -1,6-enlazados).
- 25

Referencias

- 30 [1] Deepe (1997), Clin. Microbial. Rev., 10:585-596.
[2] Cassone y Torosantucci (2006), Expert Rev. Vaccines, 5:859-867.
[3] Documento WO03/097091.

- [4] Torosantucci *et al.* (2005), J. Exp. Med., 202:597-606.
- [5] Documento WO2006/030318.
- [6] Pang *et al.* (2005), Biosci. Biotechnol. Biochem., 69:553-538.
- [7] Patente de EEUU 5504079.
- 5 [8] Takeo y Tei (1986), Carbohydr. Res., 145:293-306.
- [9] Tanaka *et al.* (2003), Tetrahedron Letters, 44:3053-3057.
- [10] Ning *et al.* (2002), Tetrahedron Letters, 43:5545-5549.
- [11] Geurtzen *et al.* (1999), Journal of Organic Chemistry, 64(21):7828-7835.
- [12] Wu *et al.* (2003), Carbohydr. Res., 338:2203-2212.
- 10 [13] Nicolaou *et al.* (1997), J. Am. Chem. Soc., 119:449-450.
- [14] Yamada *et al.* (1999), Tetrahedron Letters, 40:4581-4584.
- [15] Yamago *et al.* (2001), Org. Lett., 24:3867-3870.
- [16] Yuguo *et al.* (2004), Tetrahedron, 60:6345-6351.
- [17] Amaya *et al.* (2001), Tetrahedron Letters, 42:9191-9194.
- 15 [18] Mei *et al.* (2005), Carbohydr Res., 340:2345-2351.
- [19] Takeo *et al.* (1993), Carbohydr Res., 245:81-96.
- [20] Jamois *et al.* (2005), Glycobiology, 15(4):393-407.
- [21] Lefever *et al.* (2001), Chem. Eur. J., 7(20):4411-4421.
- [22] Huang *et al.* (2005), Carbohydr Res., 340:603-608.
- 20 [23] Patente de EEUU 5508191.
- [24] MiKyung *et al.* (2003), Biochemical Engineering Journal, 16:163-168.
- [25] Barsanti *et al.* (2001), J. Appl. Phycol., 13:59-65.
- [26] Bardotti el al. (2008), Vaccine, 26:2284-2296.
- [27] Lindberg (1999), Vaccine, 17, suppl. 2:S28-36.
- 25 [28] Buttery y Moxon (2000), J. R. Coll. Physicians Lond., 34:163-168.
- [29] Ahmad y Chapnick (1999), Infect. Dis. Clin. North Am., 13:113-133, vii.
- [30] Goldblatt (1998), J. Med. Microbiol., 47:563-567.
- [31] Documento EP-B-0 477 508.
- [32] Patente de EEUU 5.306.492.
- 30 [33] Documento WO98/42721.
- [34] Dick *et al.*, en Conjugates Vaccines (eds. Cruse *et al.*), Karger, Basilea, 1989, vol. 10, 48-114.
- [35] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego CA (1996).
- [36] Ramsay *et al.* (2001), Lancet, 357(9251):195-196.
- [37] Lees *et al.* (1996), Vaccine, 14:190-198.
- 35 [38] Documento WO95/08348.

- [39] Patente de EEUU 4.761.283.
- [40] Patente de EEUU 4.356.170.
- [41] Patente de EEUU 4.882.317.
- [42] Patente de EEUU 4.695.624.
- 5 [43] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919.
- [44] Documento EP-A-0208375.
- [45] Bethell G.S. *et al.*, J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-2574.
- [46] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-518.
- [47] Documento WO00/10599.
- 10 [48] Gever *et al.*, Med. Microbiol., Immunol, 165:171-288 (1979).
- [49] Patente de EEUU 4.057.685.
- [50] Patentes de EEUU 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [51] Patente de EEUU 4.459.286.
- [52] Patente de EEUU 5.204.098.
- 15 [53] Patente de EEUU 4.965.338.
- [54] Patente de EEUU 4.663.160.
- [55] Documento WO2007/000343.
- [56] Research Disclosure, 453077 (enero 2002).
- [57] Documento EP-A-0372501.
- 20 [58] Documento EP-A-0378881.
- [59] Documento EP-A-0427347.
- [60] Documento WO93/17712.
- [61] Documento WO94/03208.
- [62] Documento WO98/58668.
- 25 [63] Documento EP-A-0471177.
- [64] Documento WO91/01146.
- [65] Falugi *et al.* (2001), Eur. J. Immunol., 31:3816-3824.
- [66] Baraldo *et al.* (2004), Infect. Immun., 72(8):4884-4887.
- [67] Documento EP-A-0594610.
- 30 [68] Ruan *et al.* (1990), J. Immunol., 145:3379-3384.
- [69] Documento WO00/56360.
- [70] Kuo *et al.* (1995), Infect. Immun., 63:2706-2713.
- [71] Michon *et al.* (1998), Vaccine, 16:1732-1741.
- [72] Documento WO02/091998.
- 35 [73] WO01/72337.

- [74] Documento WO00/61761.
- [75] Documento WO00/33882.
- [76] Documento WO99/42130.
- [77] Documento WO96/40242.
- 5 [78] Lei *et al.* (2000), Dev. Biol. (Basilea), 103:259-264.
- [79] Documento WO00/38711.
- [80] Gennaro (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edición, ISBN: 0683306472.
- [81] Almeida y Alpar (1996), J. Drug Targeting, 3:455-467.
- [82] Patente de EEUU 6355271.
- 10 [83] Documento WO00/23105.
- [84] Documento US 5.057.540.
- [85] Documento WO96/33739.
- [86] Documento EP-A-0109942.
- [87] Documento WO96/11711.
- 15 [88] Documento WO00/07621.
- [89] Barr *et al.* (1998), Advanced Drug Delivery Reviews, 32:247-271.
- [90] Sjolanderet *et al.* (1998), Advanced Drug Delivery Reviews, 32:321-338.
- [91] Pizza *et al.* (2000), Int. J. Med. Microbiol., 290:455-461.
- [92] Documento WO95/17211.
- 20 [93] Documento WO98/42375.
- [94] Singh *et al.* (2001), J. Cont. Release, 70:267-276.
- [95] Documento WO99/27960.
- [96] Documento US 6.090.406.
- [97] Documento US 5.916.588.
- 25 [98] Documento EP-A-0626169.
- [99] Dyakonova *et al.* (2004), Int. Immunopharmacol., 4(13):1615-1623.
- [100] Documento FR-2859633.
- [101] Signorelli y Hadden (2003), Int. Immunopharmacol., 3(8):1177-1186.
- [102] Documento WO2004/06471
- 30 [103] De Libero *et al.*, Nature Reviews Immunology, 2005, 5:485-496.
- [104] Patente de EEUU 5.936.076.
- [105] Oki *et al.*, J. Clin. Investig., 113: 1631-1640.
- [106] Documento US2005/0192248.
- [107] Yang *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43:3818-3822.
- 35 [108] Documento WO2005/102049.

- [109] Goff *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126:13602-13603.
- [110] Documento WO03/105769.
- [111] Cooper (1995), Pharm. Biotechnol., 6:559-580.
- [112] Kandimalla *et al.* (2003), Nucleic Acids Research, 31:2393-2400.
- 5 [113] Documento WO02/26757.
- [114] Documento WO99/62923.
- [115] Krieg (2003), Nature Medicine, 9:831-835.
- [116] McCluskie *et al.* (2002), FEMS Immunology and Medical Microbiology, 32:179-185.
- [117] Documento WO98/40100.
- 10 [118] Patente de EEUU 6.207.646.
- [119] Patente de EEUU 6.239.116.
- [120] Patente de EEUU 6.429.199.
- [121] Kandimalla *et al.* (2003), Biochemical Society Transaction, 31 (parte 3):654-658.
- [122] Blackwell *et al.* (2003), J. Immunol., 170:4061-4068.
- 15 [123] Krieg (2002), Trends Immunol., 23:64-65.
- [124] Documento WO11/95935.
- [125] Kandimalla *et al.* (2003), BBRC, 306:948-953.
- [126] Bhagat *et al.* (2003), BBRC, 300:853-861.
- [127] Documento WO03/035836.
- 20 [128] Documento WO01/22972.
- [129] Schellack *et al.* (2006), Vaccine, 24:5461-5472.
- [130] Myers *et al.* (1990), páginas 145-156 de Cellular- and molecular aspects of endotoxin reactions.
- [131] Ulrich (2000), capítulo 16 (páginas 273-282) de la referencia 167.
- [132] Johnson *et al.* (1999), J. Med. Chem., 42:4640-4649.
- 25 [133] Baldrick *et al.* (2002), Regulatory Toxicol. Pharmacol., 35:398-413.
- [134] Documento WO 94/21292.
- [135] Documento US 4.680.338.
- [136] Documento US 4.988.815.
- [137] Documento WO92/15582.
- 30 [138] Stanley (2002), Clin. Exp. Dermatol., 27:571-577.
- [139] Wu *et al.* (2004), Antiviral Res., 64(2):79-83.
- [140] Vasilakos *et al.* (2000), Cell Immunol., 204(1):64-74.
- [141] Patentes de EEUU 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.
- [142] Jones (2003), Curr. Opin. Investig. Drugs, 4:214-218.

- [143] Documento WO2004/060308.
- [144] Documento WO2004/064759.
- [145] Documento US 6.924.271.
- [146] Documento US2005/0070556.
- 5 [147] Documento US 5.658.731.
- [148] Patente de EEUU 5.011.828.
- [149] Documento WO2004/87153.
- [150] Documento US 6.605.617.
- [151] Documento WO02/183383.
- 10 [152] Documento WO2004/018455.
- [153] Documento WO03/082272.
- [154] Johnson *et al.* (1999), Bioorg. Med. Chem. Lett., 9:2273-2278.
- [155] Evans *et al.* (2003), Expert Rev. Vaccines, 2:219-229.
- [156] Andrianov *et al.* (1998), Biomaterials, 19:109-115.
- 15 [157] Payne *et al.* (1998), Adv. Drug Delivery Review, 31:185-196.
- [158] Documento WO03/011223.
- [159] Meraldi *et al.* (2003), Vaccine, 21:2485-2491.
- [160] Pajak *et al.* (2003), Vaccine, 21:836-842.
- [161] Wong *et al.* (2003), J. Clin. Pharmacol., 43(7):735-742.
- 20 [162] Documento US2005/0215517.
- [163] Documento WO90/14837.
- [164] Podda y Del Giudice (2003), Expert Rev. Vaccines, 2:197-203.
- [165] Podda (2001), Vaccine, 19:2673-2680.
- 25 [166] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman), Plenum Press, 1995 (ISBN: 0-306-44867-X).
- [167] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine), ISBN: 1-59259-083-7, ed. O'Hagan.
- [168] Allison y Byars (1992), Res. Immunol., 143:519-525.
- [169] Hariharan *et al.* (1995), Cancer Res., 55:3486-3489.
- 30 [170] Documento WO95/11700.
- [171] Patente de EEUU 6.080.725.
- [172] Documento WO2005/09718.
- [173] Wills *et al.* (2000), Emerging Therapeutic Targets, 4:1-32.
- [174] Documento WO03/097091.
- 35 [175] Torosantucci *et al.* (2005), J. Exp. Med., 202:597-606.
- [176] Documento WO03/009869.

REIVINDICACIONES

5 1.- Un conjugado que comprende un glucano unido a una molécula portadora para su uso para prevenir o tratar una infección microbiana en un mamífero mediante el empleo del glucano como inmunógeno para proporcionar una respuesta de anticuerpos protectora, en el que el glucano está formado exclusivamente por restos glucosa β -1,3-enlazados, y en el que la molécula portadora es una toxina bacteriana, un toxoide de la toxina de la difteria, un toxoide de la toxina del tétanos, o CRM197.

2.- El conjugado para uso según la reivindicación 1, en el que glucano es β -D-glucopiranosa lineal que contiene exclusivamente enlaces 1,3.

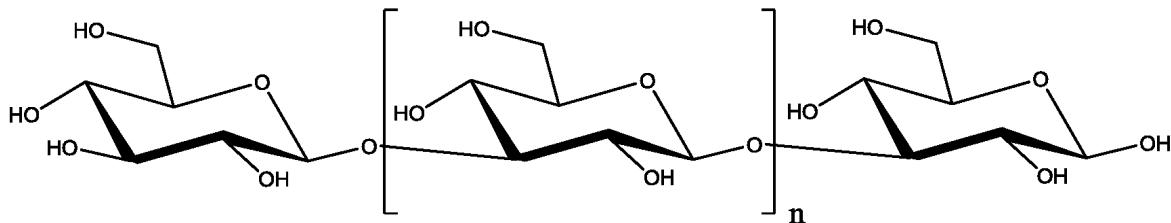
10 3.- El conjugado para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es un curdlano, paramilo, o uno de sus fragmentos.

4.- El conjugado para uso según la reivindicación 3, que es un fragmento de la hidrólisis del curdlano.

5 5.- El conjugado para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene 2-60 unidades de monosacárido de glucosa.

15 6.- El conjugado para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el glucano es una única especie molecular.

7.- El conjugado para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el glucano tiene la siguiente estructura:



en la que $n+2$ está en el intervalo de 11-19.

20 8.- El conjugado para uso según la reivindicación 7, en el que $n+2 = 15$.

9.- El conjugado para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula portadora es CRM197.

10.- El conjugado para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el conjugado se utiliza para generar una respuesta antiglucano en un mamífero.

25 11.- El conjugado para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el conjugado se utiliza para tratar o proteger frente a infecciones de especies de *Candida*; especies de *Cryptococcus*; especies de *Enterococcus*; especies de *Streptococcus*; especies de *Leishmania*; especies de *Acanthamoeba*; especies de *Aspergillus*; especies de *Pneumocystis*; especies de *Mycobacterium*; especies de *Pseudomonas*; especies de *Staphylococcus*; especies de *Trichophyton*; especies de *Blastomyces*; especies de *Histoplasma*; especies de *Paracoccidioides*; especies de *Pythium*; y especies de *Escherichia*.

30 35 12.- El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el conjugado se utiliza para prevenir o tratar la candidiasis, candidemia, aspergilosis, criptococosis, dermatomicosis, esporotricosis y otras micosis subcutáneas, blastomicosis, histoplasmosis, coccidiomicosis, paracoccidiomicosis, neumocistosis, afta, tuberculosis, micobacteriosis, infecciones respiratorias, escarlatina, neumonía, impétigo, fiebre reumática, sepsis, septicemia, leishmaniasis cutánea y visceral, acantamebiasis corneal, fibrosis quística, fiebre tifoidea, gastroenteritis y síndrome hemolítico-urémico e infecciones en pacientes con SIDA.

Figura 1

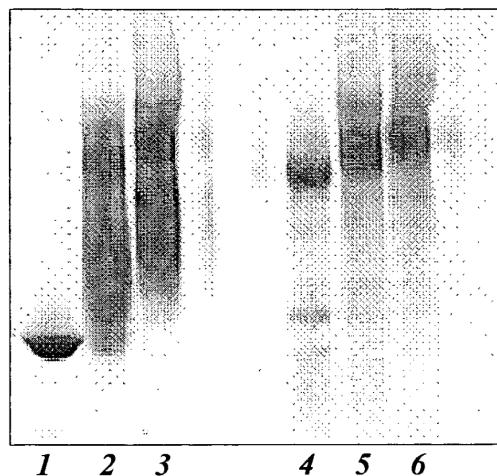


Figura 2

Figura 2A

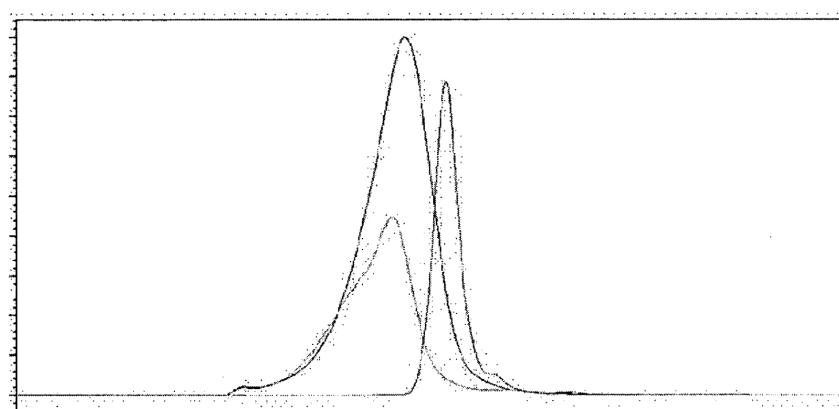


Figura 2B

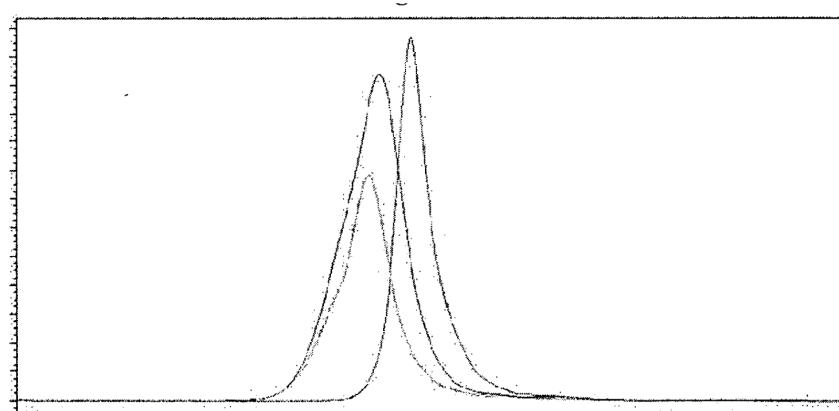


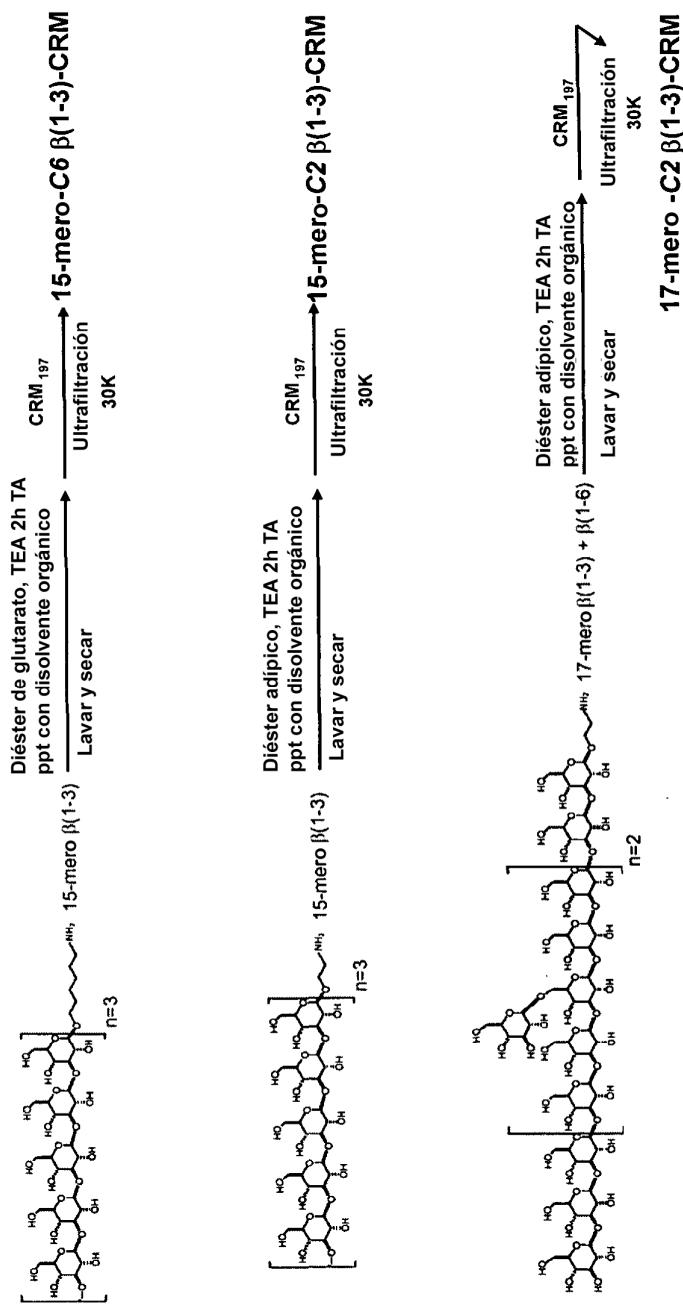
Figura 3

Figura 4

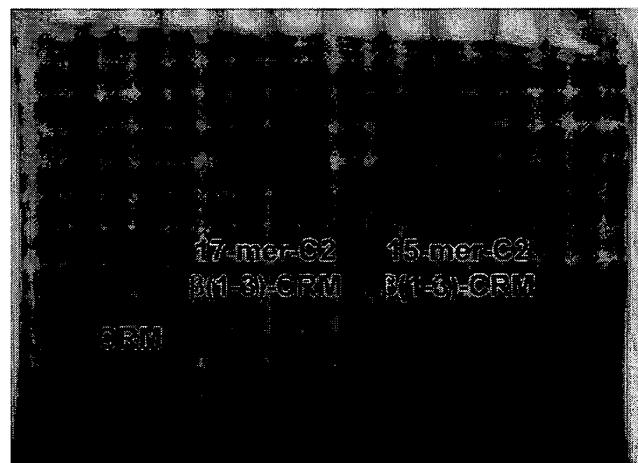
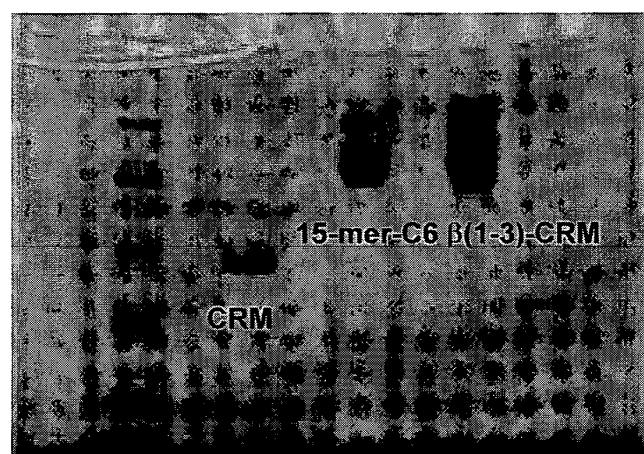


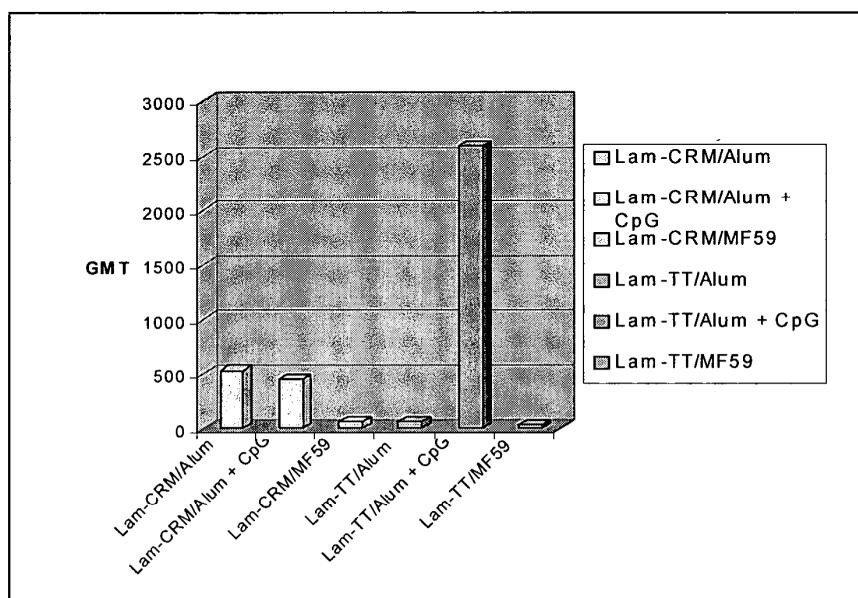
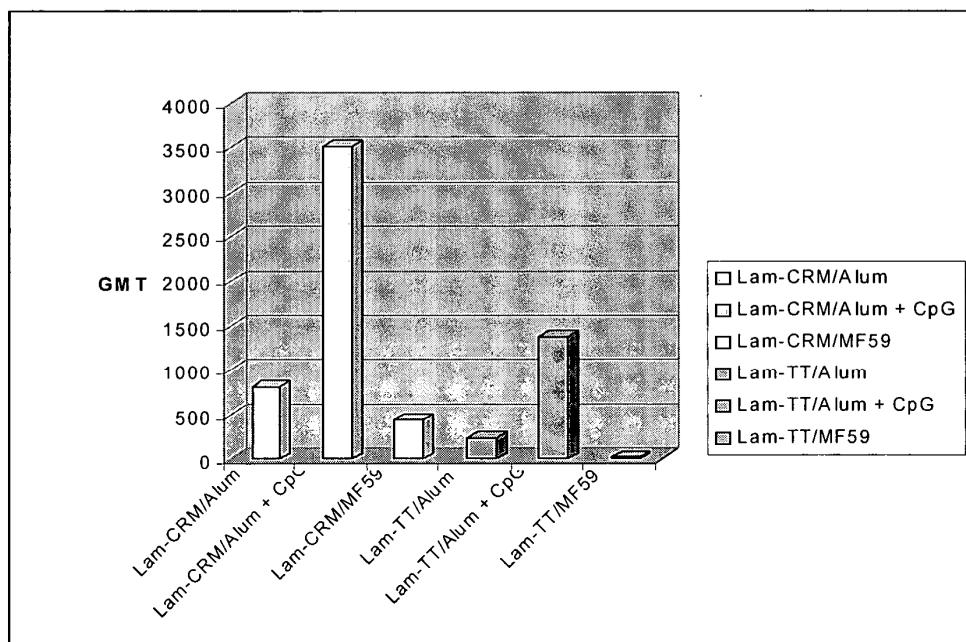
Figura 5**Figura 6**

Figura 7

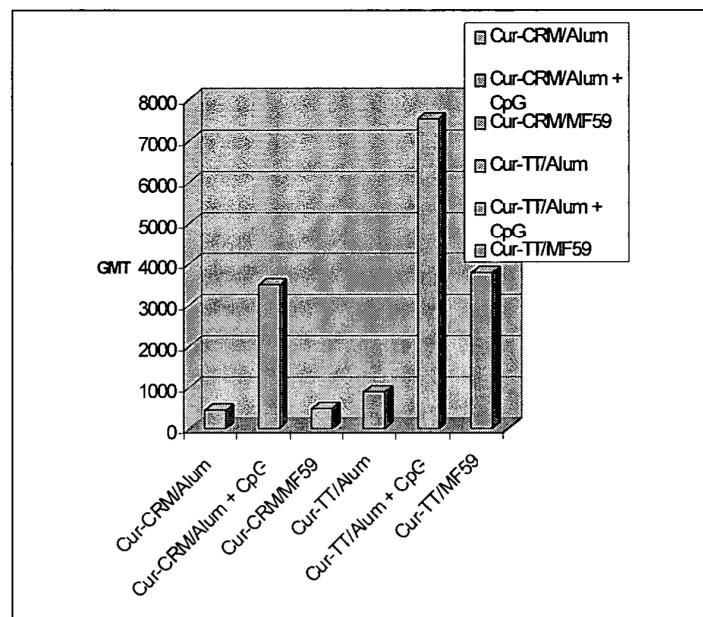


Figura 8

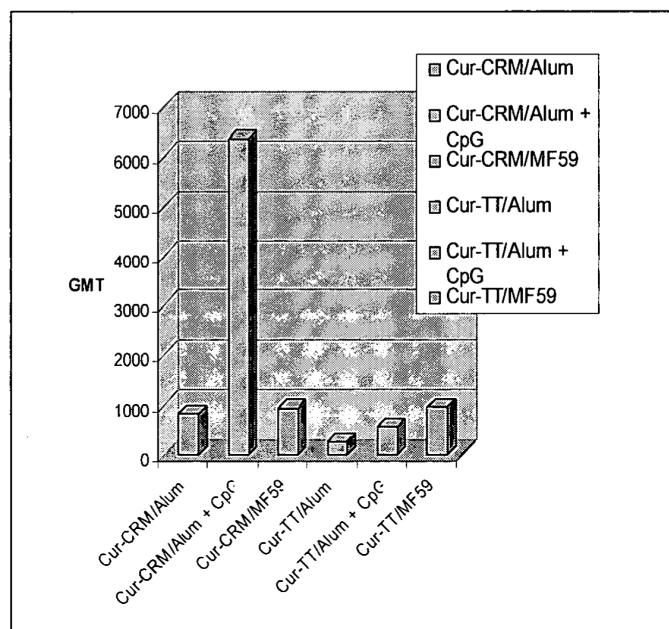


Figura 9

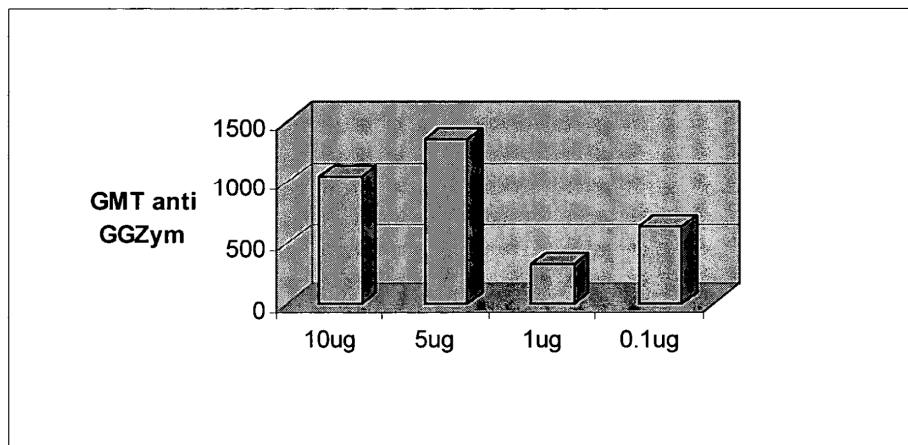


Figura 10

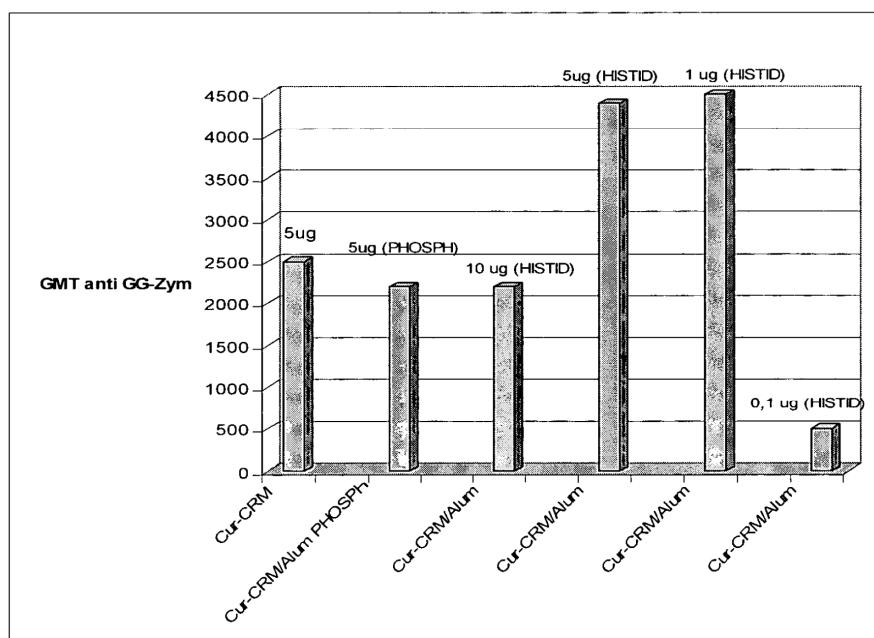


Figura 11

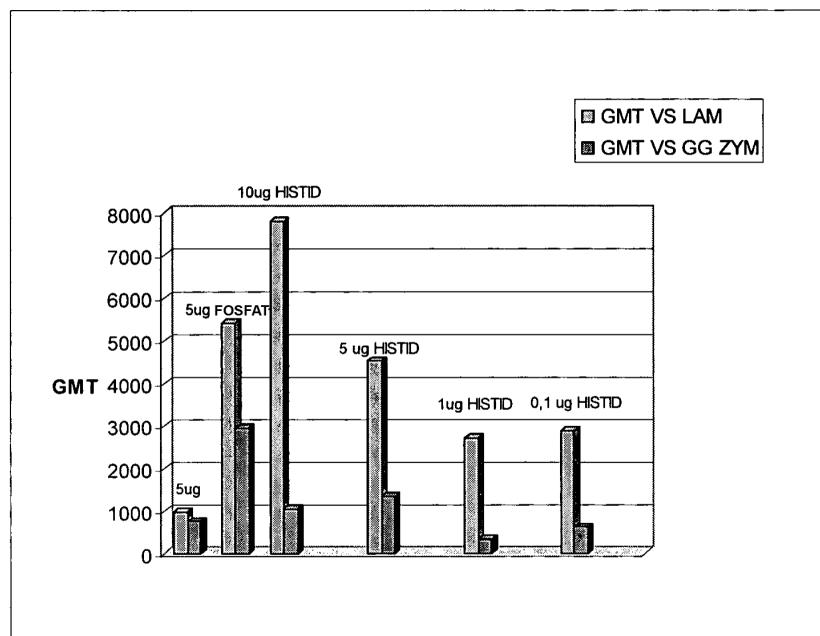


Figura 12

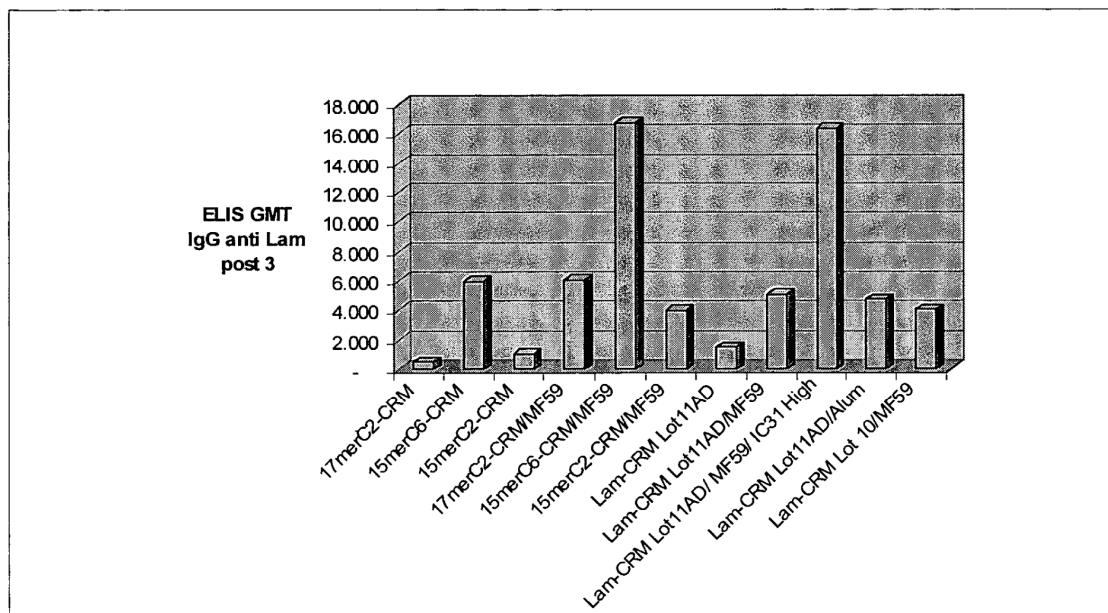


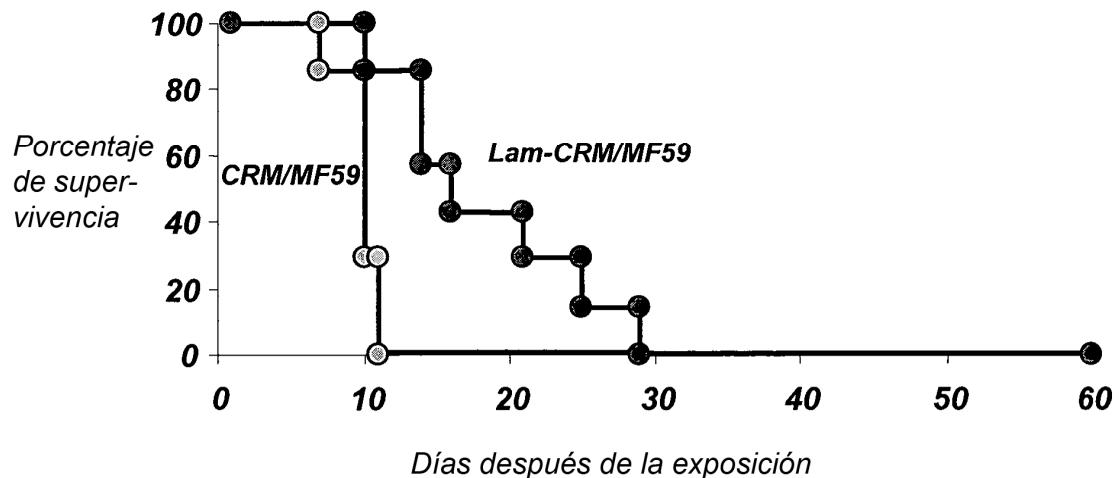
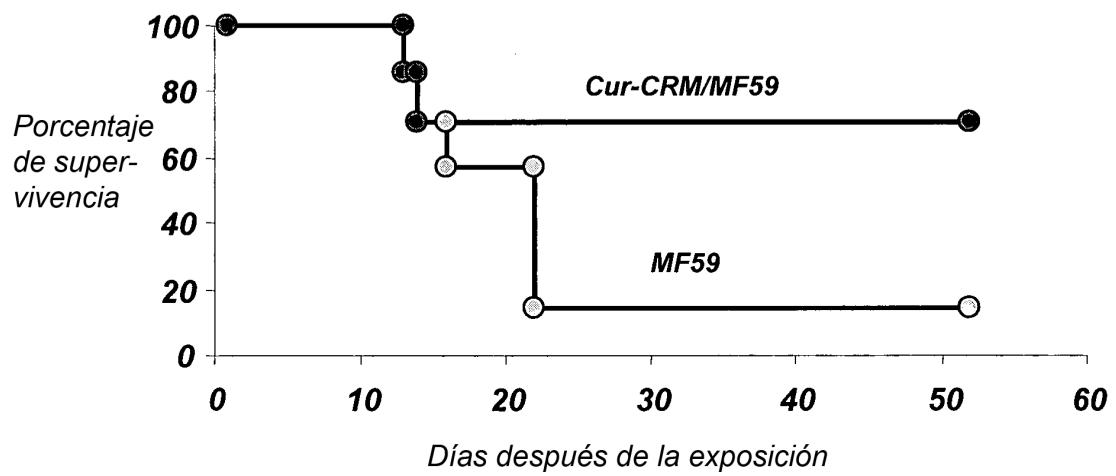
Figura 13**Figura 14**

Figura 15