



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 086**

51 Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **99957822 .2**

96 Fecha de presentación : **15.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1140158**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

54 Título: **Vacuna multicomponente que comprende por lo menos dos antígenos de *Haemophilus influenzae*.**

30 Prioridad: **15.12.1998 US 210995**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **29.11.2010**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **29.11.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **29.11.2010**

73 Titular/es: **Sanofi Pasteur Limited**
1755 Steeles Avenue West
Toronto, Ontario M2R 3T4, CA

72 Inventor/es: **Loosmore, Sheena, M.;**
Yang, Yan-Ping y
Klein, Michel, H.

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 272 086 T5

DESCRIPCIÓN

Vacuna multicomponente que comprende por lo menos dos antígenos de *Haemophilus influenzae*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la vacunología y, en especial, a la vacuna multicomponente que comprende las proteínas recombinantes de *Haemophilus influenzae* que es útil en la protección contra la enfermedad producida por *Haemophilus influenzae*, incluyendo la otitis media.

10 **Antecedentes de la invención**

Haemophilus influenzae es la causa de varias enfermedades humanas graves tales como la meningitis, epiglotitis, septicemia y otitis media. Existen seis serotipos de *H. influenzae*, denominados a a f, que se identifican por su polisacárido capsular. *H. influenzae* tipo b (Hib) era la causa principal de la meningitis bacteriana hasta la introducción de varias vacunas y conjugadas de Hib en los años 80 (ref. 1). Las vacunas basadas en el polisacárido capsular tipo b de *H. influenzae* conjugado con la vacuna antidiftérica (ref. 2), vacuna antitetánica (ref. 3 y patente US n° 4.496.538) o la proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (ref. 4) han sido eficaces en la reducción de la meningitis producida por el tipo b de *H. influenzae*. Los demás serotipos de *H. influenzae* están asociados a la enfermedad invasora con poca frecuencia, aunque parece que existe un aumento de la frecuencia de la enfermedad producida por estas cepas a medida que disminuye la frecuencia de la enfermedad por Hib (refs. 5, 6). Las *H. influenzae* (NTHi) no encapsuladas ni tipificables son también responsables de una amplia gama de enfermedades humanas incluyendo otitis media, epiglotitis, neumonía y traqueobronquitis. La incidencia de la enfermedad producida por NTHi no ha estado afectada por la introducción de las vacunas Hib (ref. 7).

La otitis media es la enfermedad más frecuente de la infancia precoz, experimentando la 60 a 70% de todos los niños menores de 2 años, entre una y tres infecciones de oído (ref. 8). La otitis media crónica es responsable de las alteraciones auditivas, del habla y cognitivas en los niños. Las infecciones por *H. influenzae* suman aproximadamente el 30% de los casos de otitis media aguda y aproximadamente el 60% de la otitis media crónica. Solo en los Estados Unidos, el tratamiento de la otitis media cuesta entre uno y dos billones de dólares al año, en antibióticos y procedimientos quirúrgicos, tales como angiectomías, adenoidectomías e inserción de tubos para timpanostomía. Se estima que se gastan unos 30 billones de \$ adicionales al año en terapias asociadas tales como terapia del habla y clases de educación especiales. Además, muchos de los organismos causantes de la otitis media se están volviendo resistentes al tratamiento con antibióticos. Por lo tanto es deseable una vacuna profiláctica eficaz contra la otitis media.

Durante la infección natural por NTHi, las proteínas de la membrana externa expuestas en la superficie que estimulan una respuesta del anticuerpo son dianas importantes en potencia para los anticuerpos bactericidas y/o protectores y por lo tanto potenciales vacunas experimentales. Barenkamp y Bodor (ref. 9) demostraron que los sueros de niños convalecientes que padecen otitis media debida a la NTHi, contenían anticuerpos contra proteínas de alto peso molecular (HMW). Aproximadamente del 70 al 75% de las cepas de NTHi expresan las proteínas de HMW y la mayoría de estas cepas contienen dos grupos de genes denominados *hmw1ABC* y *hmw2ABC* (refs. 10 y 11). se ha demostrado que las proteínas HMW son adhesinas que median en el acoplamiento a las células epiteliales humanas (ref. 12). La inmunización con una mezcla de proteínas naturales HMW1A y HMW2A produjo protección parcial en el modelo otitis media en la prueba de provocación intravesicular con chinchilla (ref. 13).

La patente US n° 5.603.938 (Barenkamp), asignada a St-Louis University a Washington University, describe la clonación, expresión y secuenciado de los genes que codifican las proteínas HMW1 y HMW2 de la cepa 12 de *Haemophilus* no tipificable. Las proteínas HMW son una familia de proteínas de *Haemophilus* no tipificable de peso molecular de aproximadamente 100 a 125 kDa que se encuentran en las cepas de *Haemophilus* no tipificable. Las proteínas HMW están ausentes en las cepas encapsuladas de *Haemophilus*.

La producción de proteínas HMW naturales a partir de cepas de *H. influenzae* es muy baja y se ha descrito un método para producir proteínas HMW recombinantes (rHMW) protectoras en el documento WO 00/20609. Se ha desarrollado específicamente un modelo de colonización nasofaríngea en chinchilla para demostrar la eficacia de las adhesinas en la vacuna (ref. 14) y las proteínas rHMW son protectoras en este modelo descrito en el documento WO 00/20609. Las proteínas rHMW1A y rHMW2A se presentan para proporcionar protección equivalente entre sí y la proteína rHMW1A se seleccionó para estudios de la vacuna adicionales. En esta solicitud, rHMW se refiere a la proteína HMW1A recombinante de la cepa 12 de NTHi, aunque la proteína HMW1A recombinante correspondiente de otras cepas NTHi y la proteína rHMW2A correspondiente de las cepas NTHi pueden ser empleadas por la rHMW. Asimismo puede emplearse las proteínas naturales correspondientes.

Cuando bajo sobrecarga ambiental, tal como temperatura elevada, los organismos producen un exceso de respuesta a la sobrecarga o de proteínas de choque térmico (hsp) se ha demostrado que las hsp bacterianas son inmunógenos importantes, que estimulan tanto los linfocitos B como los linfocitos T (ref. 16). Las proteínas HtrA bacterianas o las del choque térmico DegP se expresan en las condiciones de sobrecarga y la proteína HtrA de *H. influenzae* se ha demostrado que es un antígeno parcialmente protector en el modelo de prueba de provocación intravesicular de la otitis media (ref. 17). Las proteínas HtrA son serina proteasas y su actividad proteolítica las hace inestables. Además, como componente de una vacuna multicomponente, la proteína HtrA natural degrada los antígenos mezclados. En

la patente US n° 5.506.139 (Loosmore *et al.*), asignada al cesionario de la misma se han descrito completamente la mutagénesis dirigida al sitio del gen *htrA* de *H. influenzae* (denominado *hin47*) y las propiedades de los mutantes. Se ha demostrado que el análogo de HtrA no proteolítico, H91A Hin47, es un antígeno protector contra la bacteremia producida por *H. influenzae* tipo b y contra la otitis media por *H. influenzae* no tipificable (ref. 17). Dicho análogo se utiliza en la presente memoria, aunque puede emplearse cualquier otro análogo no proteolítico de la proteína Hin47. Se descubrió HtrA en todas las cepas examinadas incluyendo todas las cepas encapsuladas de *H. influenzae*.

Aunque el principal objetivo de una vacuna profiláctica contra la enfermedad por *H. influenzae*, incluyendo la otitis media, es prevenir el asentamiento de la colonización nasofaríngea que incluye una adhesina como inmunógeno, las proteínas HMW no están presentes en *H. influenzae* encapsulada o en aproximadamente el 25% de las cepas NTHi. Por consiguiente, una vacuna de combinación compuesta de por lo menos una molécula de adhesina y un antígeno protector adicional hallado en todas las cepas de *H. influenzae*, proporcionará mejor cobertura frente a la enfermedad y un amplio espectro de protección de la enfermedad.

Sería deseable proporcionar vacunas de combinación eficaces que comprendan componentes de *H. influenzae* que contengan cantidades relativas seleccionadas de los antígenos seleccionados.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al aporte de una vacuna multicomponente para proteger contra la enfermedad causada por infección con *Haemophilus influenzae*, incluyendo la otitis media.

Según la presente invención, se proporciona una composición inmunógena para dispensar protección en una enfermedad contra el huésped producida por la infección por *Haemophilus influenzae*, incluyendo la otitis media, que comprende

25 a 100 μ g de un análogo de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* que presenta una actividad de proteasa disminuida que es menor de aproximadamente el 10% de la que presenta la proteína Hin47 de tipo salvaje, y

25 a 100 μ g de una proteína de alto peso molecular (HMW) de una cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable.

En dicha composición, la proteína HMW está presente en una cantidad que aumente la respuesta inmunitaria en el huésped a la proteína Hin47 mientras que no existe interferencia entre los componentes con respecto a sus inmunogenicidades individuales.

El análogo de la proteína Hin47 puede ser aquel en el que por lo menos un aminoácido de la proteína Hin 47 de tipo salvaje que contribuye a la actividad de proteasa se ha eliminado o sustituido por un aminoácido diferente y que presenta sustancialmente las mismas propiedades inmunógenas que la proteína Hin47 de tipo salvaje.

Por lo menos dicho aminoácido puede seleccionarse de entre el grupo constituido por los aminoácidos 91, 121 y 195 a 207 de la proteína Hin47 de tipo salvaje. Los mutantes específicos que pueden utilizarse incluyen serina-197 sustituida por alanina, histidina-91 sustituida por alanina, lisina o arginina y Asp-121 sustituida por alanina.

La proteína HMW de la cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae* puede ser una proteína HMW1 o HMW2 y puede producirse de modo recombinante. Las proteínas HMW1 y HMW2 proceden de las cepas respectivas de *Haemophilus influenzae* no tipificable y poseen pesos moleculares respectivos indicados en la Tabla I siguiente:

TABLA I

Peso molecular (kDa)		Cepa de <i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable						
Proteína madura:		12	JoyC	K21	LCDC2	PMH1	15	
	HMW1	125	125,9	104,4	114,0	102,4	103,5	
	HMW2	120	100,9		111,7	103,9	121,9	

La composición inmunógena de la invención puede formularse más con un adyuvante. Dicho adyuvante para su utilización en la presente invención puede incluir (pero no se limita a) fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, QS21, Quil A, derivados y componentes de los mismos, matriz ISCOM, fosfato cálcico, hidróxido de calcio, hidróxido de cinc, análogo de glucolípido, un éster octadecílico de un aminoácido, un muramil dipéptido, polifosfaceno, ISCOMPREP, DC-col, DDBA y una lipoproteína y otros adyuvantes, incluyendo las toxinas bacterianas, los componentes y derivados de las mismas descritos, por ejemplo en el documento WO 95/34323. En circunstancias especiales,

son deseables los adyuvantes que provocan una respuesta a Th1. En el documento 95/34308 se describen combinaciones ventajosas de adyuvantes. El adyuvante preferentemente puede comprender fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio (conocido habitualmente como alúmina).

Los componentes de la composición inmunógena están presentes en cantidades apropiadas para proporcionar la respuesta inmunitaria deseada. Los componentes pueden formularse como vacuna para la administración *in vivo* al huésped.

Pueden formularse composiciones inmunógenas con otros componentes antigénicos para proporcionar una vacuna multivalente en la que el o los componente(s) antigénico(s) adicional(es) dispensa(n) protección contra la enfermedad producida por otro(s) patógeno(s). Dichos antígenos adicionales deberían ser tales que, y deberían estar presentes en cantidades que, la inmunogenicidad de los componentes aislados de la vacuna resultante no estuviera alterada por otros componentes aislados de la composición. Dichos antígenos adicionales preferentemente son antígenos purificados en cantidades definidas para producir una vacuna del componente.

Dichos antígenos adicionales pueden ser los hallados habitualmente en las vacunas protectoras multivalentes, tales como el toxoide diftérico, el toxoide tetánico y antígenos de la tos ferina, incluyendo el toxoide de la tos ferina, la hemoaglutinina filamentosa, pertactina y/o aglutinógenos.

La vacuna multivalente resultante también puede contener poliovirus no virulentos, tales como poliovirus inactivados, que pueden ser poliovirus de tipo 1, de tipo 2 y/o de tipo 3. La vacuna multicomponente puede comprender además un conjugado del toxoide tetánico o toxoide diftérico y un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae*, preferentemente PRP-T.

La presente invención se extiende además a la composición inmunógena de la invención cuando se utiliza como vacuna.

Las ventajas de la presente invención incluyen una vacuna multicomponente que puede dispensar protección contra las enfermedades por *Haemophilus influenzae* encapsulada y no encapsulada de manera segura y eficaz.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la descripción siguiente haciendo referencia a los dibujos, en los que:

La Figura 1, que tiene los paneles A a E, presenta las respuestas inmunitarias a anti-H91A, Hin47 para las vacunas de la combinación H91A Hin47 + rHMW en ratones. Panel A, rHMW no añadida; panel B, 0,3 µg de rHMW añadida; panel C, 1,0 µg de rHMW añadida; panel D, 3,0 µg de rHMW añadida; panel E, 10 µg de rHMW añadida. Las flechas indican el momento de las inmunizaciones;

la Figura 2 es un gráfico de barras que presenta el efecto sinérgico sobre la respuesta inmunitaria primaria a baja dosis (0,3 µg) de H91A Hin47 por la adición de rHMW;

la Figura 3, que tiene los paneles A a D, presenta las respuestas inmunitarias a anti-rHMW para las vacunas de la combinación H91A Hin47 + rHMW en ratones. Panel A, H91A Hin47 no añadida; panel B, 0,3 µg de H91A Hin47 añadida; panel C, 1,0 µg de H91A Hin47 añadida; panel D, 3,0 µg de H91A Hin47 añadida. Las flechas indican el momento de las inmunizaciones;

la Figura 4 es un gráfico de barras que presenta el efecto sinérgico sobre la respuesta inmunitaria primaria a alta dosis (10 µg) de rHMW por la adición de H91A Hin47;

la Figura 5, que tiene los paneles A a D, presenta las respuestas inmunitarias a anti-HMW para las vacunas de la combinación H91A Hin47 + rHMW en cobayas. Panel A, rHMW no añadida; panel B, 25 µg de rHMW añadida; panel C, 60 µg de rHMW añadida; panel D, 100 µg de rHMW añadida. Las flechas indican el momento de las inmunizaciones;

la Figura 6, que tiene los paneles A a D, presenta las respuestas inmunitarias a anti-rHMW para las vacunas de la combinación H91A Hin47 + rHMW en cobayas. Panel A, H91A Hin47 no añadida; panel B, 25 µg de H91A Hin47 añadida; panel C, 50 µg de H91A Hin47 añadida; panel D, 100 µg de H91A Hin47 añadida. Las flechas indican el momento de las inmunizaciones;

la Figura 7 presenta la protección de la vacuna de la combinación H91A Hin47 + rHMW en el modelo de chinchilla de la otitis media;

la Figura 8 presenta la protección de la vacuna de la combinación H91A Hin47 + rHMW en el modelo de chinchilla de colonización nasofaríngea.

la Figura 9, que tiene los paneles A y B, son análisis SDS-PAGE que presentan el perfil de estabilidad de la vacuna de la combinación H91A Hin47 + rHMW los días 0 (panel A) y 14 (panel B), en comparación con los componentes aislados;

la Figura 10A es un gráfico de barras de la respuesta inmunitaria a H91A y rHMW en presencia y ausencia de Pentacel®;

la Figura 10B, que tiene los paneles A y B, contiene un gráfico de barras de la respuesta inmunitaria al toxoide de la tos ferina (PT), hemoaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (69 kDa), aglutinógenos con franjas (panel A), toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), polio tipo 1, polio tipo 2 y PRP-T (panel B) en Pentacel® cuando el Pentacel® se administra solo o con los dos componentes H91A + rHMW de la vacuna contra *H. influenzae*;

la Figura 11 presenta un esquema de construcción para la preparación del plásmido DS-2150-1 que contiene el gen H91 A *hin47* mutante bajo el control de un activador de T7; y

la Figura 12 presenta un esquema de construcción para la preparación del plásmido BK-76-11 que contiene el gen A *hmw* IABC bajo el control de un activador de T7.

Descripción general de la invención

La colonización de la nasofaringe es la primera etapa en el desarrollo de la enfermedad para muchos patógenos bacterianos o víricos, incluyendo *Haemophilus influenzae*, y las vacunas que contienen moléculas de adhesina deberían protegerse contra la primera etapa en la evolución de la enfermedad. Se ha demostrado que las proteínas de elevado peso molecular (HMW), encontradas en aproximadamente el 75% de *H. influenzae* no tipificable, son adhesinas que son protectoras contra la colonización cuando se administran en una composición de vacuna. Las proteínas HMW no están presentes en las cepas encapsuladas de *H. influenzae* o en aproximadamente el 25% de las cepas de *H. influenzae* no tipificables, y por consiguiente no están lo suficiente solas, para una vacuna que presenta amplia protección para la cepa.

La proteína HtrA o Hin47 se encuentra en todas las cepas de *H. influenzae* encapsuladas y no tipificables. Hin47 es protectora contra la bacteremia causada por *H. influenzae* tipo b y la otitis media causada por *H. influenzae* no tipificable, pero no previene por sí misma la colonización. Hin47 es proteolítica y no puede utilizarse en las formulaciones de proteínas. Una vacuna de combinación que comprende los antígenos HMW y Hin47 no proteolítico pueden formularse para proteger contra la enfermedad significativa por *H. influenzae*, incluyendo la otitis media. La presente invención proporciona dicha vacuna de la combinación.

La patente US nº 5.506.139 (Loosmore *et al.*) describe la preparación de análogos de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* que presentan una disminución de la actividad de la proteasa que es menor de aproximadamente el 10% del de la proteína Hin47 natural y que preferentemente presenta sustancialmente las mismas propiedades inmunógenas que la proteína Hin47 natural. La patente también describe el aislamiento, purificación y caracterización de las moléculas de ácido nucleico que codifican los análogos de Hin47. La proteína Hin47 natural se conserva inmunológicamente entre las cepas no tipificables y de tipo b de *H. influenzae*. La secuencia de aminoácidos de la proteína Hin47 natural y la secuencia de nucleótidos del gen *hin47* codificador se describen en el documento WO 94/00149 publicado el 6 de enero de 1994.

Los análogos de Hin47 de la patente US nº 5.506.139 se preparan eliminando o sustituyendo por un aminoácido diferente, por lo menos un aminoácido del Hin47 natural que contribuye a la actividad de la proteasa o insertando por lo menos un aminoácido en la proteína Hin47 natural, como se describe específicamente en la presente memoria. Por lo menos un aminoácido eliminado o sustituido puede seleccionarse de entre los aminoácidos 195 a 201 de Hin47 y específicamente puede ser la serina-197, que puede ser eliminada o sustituida por alanina. Además, por lo menos un aminoácido eliminado o sustituido puede ser His-91 y puede ser eliminado o sustituido por alanina, lisina o arginina. Además, por lo menos un aminoácido eliminado o sustituido puede ser Asp-121 y puede ser eliminado o sustituido por alanina.

En la patente US nº 5.869.302, asignada al cesionario de la misma, se describen múltiples mutaciones efectuadas en diferentes aminoácidos de la proteína Hin47 natural para proporcionar el análogo de Hin47 no proteolítico.

En la presente invención, la mutación de histidina 91 en alanina (denominada a veces en la presente memoria "H91A") se emplea como ilustración de la proteína Hin47 mutante, si bien pueden utilizarse otros mutantes de Hin47 con actividad de proteasa reducida como los descritos en la patente mencionada anteriormente y en la solicitud.

La preparación de la proteína HMW de manera recombinante (rHMW) se describe en el documento WO 00/20609 mencionado anteriormente.

La composición de vacunas multicomponente es crítica. Los componentes de la vacuna pueden ser compatibles y pueden combinarse en proporciones apropiadas para impedir la interferencia antigénica y optimizar algunas sinergias posibles. Si se administra con otras vacunas implantadas, no deben interferir con la protección proporcionada por la vacuna contra otra(s) enfermedad(es).

En la experimentación específica realizada en la presente memoria, se compararon varias relaciones de antígeno para una vacuna de dos componentes H91A Hin47 + rHMW, en dos especies animales. Se observó la interferencia antigénica aumentando las cantidades de H91A Hin47 cuando se combinaban con una dosis baja de rHMW, sin embargo, este efecto desapareció a dosis mayores de rHMW. Hubo un efecto sinérgico observado para aumentar las cantidades de rHMW en la respuesta primaria del anticuerpo a una dosis baja de H91A Hin47 y H91A Hin47 mejoró la respuesta primaria a rHMW, si la rHMW no estaba presente en baja dosis. Estos descubrimientos son sorprendentes porque un solo antígeno (H91A Hin47) pueden ser tanto sorprendentes como un efecto potenciador en el otro antígeno (rHMW) dependiendo de la dosis de rHMW presente. Fue también sorprendente que rHMW aumentasen la respuesta vigorosa del anticuerpo a H91A Hin47, ya que es un inmunógeno más débil.

Con referencia a la Fig. 1, se ilustra la respuesta inmunitaria en ratones al antígeno Hin47 de H91A de los dos componentes H91A Hin47 + vacuna rHMW. Las valoraciones de anticuerpo elevado se consiguen con todas las combinaciones de la vacuna en la extracción de sangre final, pero para la respuesta primaria a dosis baja de H91A Hin47, parece existir una diferencia entre las muestras con y sin rHMW. En relación con la Fig. 2, se ilustra los análisis estadísticos del efecto sinérgico observado en la respuesta inmunitaria primaria a H91A Hin47, al aumentar las cantidades de rHMW que se añaden a una dosis de 0,3 μ g de H91A Hin47.

Con referencia a la Fig. 3, se ilustra la respuesta inmunitaria en ratones al antígeno rHMW de los dos componentes H91A Hin47 + vacuna rHMW. Las valoraciones de anticuerpo elevado se consiguen en la extracción de sangre final con todas las combinaciones de la vacuna excepto en las que contienen la dosis más baja de rHMW. Parece existir una disminución drástica en la respuesta al anticuerpo cuando la dosis mayor de rHMW se combina con cantidades crecientes de H91A Hin47. En relación con la Fig. 4, se ilustra el análisis estadístico del efecto sinérgico efectuado en la respuesta inmunitaria primaria a una dosis de 10 μ g de rHMW combinada con cantidades crecientes de H91A Hin47.

Con referencia a la Figura 5, se ilustra la respuesta inmunitaria en cobayas para el componente Hin47 de H91A de las vacunas de combinación de Hin47 de H91 A + rHMW. No existe diferencia estadística en la respuesta de Hin47 anti-H91A a cualquiera de las vacunas. En relación con la Fig. 6, se ilustra la respuesta inmunitaria en cobayas al componente rHMW de las vacunas de la combinación H91A Hin47 + rHMW: no existe diferencia estadística en la respuesta anti-HMW a ninguna de las vacunas.

Con relación a la Fig. 7, se ilustra la protección proporcionada por una vacuna de la combinación H91A Hin47 + rHMW en el modelo de la prueba de provocación intravesicular de la otitis media, en comparación con la proteína proporcionada por el componente H91A Hin47 solo. Ambas vacunas son protectoras en parte. Con relación a la Fig. 8, se ilustra la protección proporcionada por una vacuna de la combinación H91A Hin47 + rHMW en el modelo de colonización nasofaríngeo, en comparación con la protección por el componente rHMW solo. Ambas vacunas son muy protectoras.

En relación con la Fig. 9, se ilustra el perfil de estabilidad de la vacuna H91A Hin47 + rHMW los días 0 y 14. Los dos antígenos permanecen adsorbidos en la alúmina en el último punto de tiempo y no se degradan.

Con relación a las Figs. 10A y 10B, se ilustra la respuesta inmunitaria en cobayas, a los antígenos H91 A Hin47 y rHMW de la vacuna de *H. influenzae* de dos componentes proporcionada sola o administrada conjuntamente con Pentacel® (toxoides diftérico + toxoides tetánico + polio tipo 1 + polio tipo 2 + polio tipo 3 + PRP-T + vacuna contra la tos ferina acelular compuesta de toxoides de la tos ferina + hemoaglutinina filamentosa + pertactina de 69 kDa + aglutinógenos estriados). Se ilustra asimismo la respuesta inmunitaria a los antígenos de Pentacel® administrados solos o administrados conjuntamente con la vacuna de *H. influenzae* de dos componentes. No existe ningún efecto sinérgico o supresor significativo de las vacunas multicomponentes administradas conjuntamente.

En el documento WO 98/00167, asignado al cesionario del mismo, se describen las formulaciones de Pentacel®.

Depósitos biológicos

Determinados vectores que contienen el ácido nucleico que codifica una proteína de alto peso molecular de una cepa no tipificable de *Haemophilus* que se describen y se refieren a la que se ha depositado en la presente memoria con la American Type Culture Collection (ATCC) situada en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos, de acuerdo con el Tratado de Budapest y antes de la presentación de la presente solicitud. Las muestras de los vectores depositados estarán disponibles al público y todas las limitaciones impuestas o el acceso a los depósitos se recibirán en el momento de la concesión de una patente basada en la presente solicitud de patente de Estados Unidos. Además, el depósito se sustituirá si las muestras viables no pueden ser distribuidas por el depositario.

Sumario del depósito

Plásmido	ATCC	Fecha de depósito
BK-76-1-1	203261	25 de septiembre de 1998

Ejemplos

La exposición anterior describe de forma general la presente invención. Una comprensión más completa puede conseguirse con relación a los Ejemplos específicos siguientes.

Los métodos de genética molecular, bioquímica de proteínas, tecnología de inmunología y fermentación utilizados, pero no descritos de manera explícita en esta exposición y estos Ejemplos, se divulgan ampliamente en la bibliografía científica y están comprendidos dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

Ejemplo 1

Este Ejemplo describe la preparación del componente de la vacuna H91A Hin47.

El mutante H91A Hin47 se preparó como se describe en la patente US nº 5.506.139. En resumen, se sintetizó un oligonucleótido 5' ATCAATAACAGCATTATTGGT 3' (SEC. ID nº: 1) que cambiaría el resto de histidina en la posición 91 en la proteína Hin47 por una alanina (ref. 17).

El plásmido JB-1276-1-2 es un plásmido a base de pUC que contiene el gen T7/*hin47* en un fragmento *EcoR* I y se utilizó para clonar el gen *hin47* en M13mp18 para la mutagénesis dirigida al sitio con el kit de mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* de Amersham. La preparación del plásmido JB-1276-1-2 se describe en la patente US nº 5.506.139. La mutación del codón de His91 en Ala91 se confirmó por secuenciado local. El gen *hin47* mutante de H91 A se subclonó en pT7-7 para generar el plásmido DS-127-19 (Fig. 11).

El plásmido con expresión de H91A Hin47 (DS-1277-19) utiliza la selección de ampicilina. Se clonó el gen *hin47* de T7/H91A en pBR328 de modo que pudo utilizarse la selección de tetraciclina. El vector DS-1312-12 era por lo tanto un plásmido a base de pBR328 que contenían las secuencias del gen *hin47* de T7/H91A entre las secuencias *EcoR* I y *Cla* I, con los genes operativos con resistencia a la ampicilina y tetraciclina y que contiene una repetición de las secuencias *Hind* III-*Bam* H I que se encuentran tanto en pBR328 como en pEVvrfl.

Se construyó un nuevo plásmido basado en DS-1312-12 que utiliza la selección de kanamicina. En la Figura 11 se presenta el esquema de construcción. Se digirió el ADN del plásmido procedente de DS-1312-12 con *Hind* III generando dos fragmentos. El fragmento mayor de 5,9 kb contenía un gen *tetR* sin activador, el gen *ampR* y el gen *hin47* de T7/H91A y se volvió a ligar en el propio vector DS-2140-3 de autocreación. Se digirió el plásmido DS-2140-3 con *Pst* I y el gen *kanR* procedente del plásmido pUC-4K (P-L Biochemicals) se insertó en la secuencia *Pst* I, generando el plásmido DS-2150-1 que es *kanR* y sensible tanto a la ampicilina como a la tetraciclina.

Se preparó el ADN del plásmido de DS-2150-1 en 50 ml de cultivo utilizando un protocolo basado en el procedimiento de Holmes y Quigley (ref. 18) y que incluía extracciones con fenol y cloroformo. Las células BL21 (DE3) de *E. coli* se hicieron electrocompetentes de la forma siguiente. En resumen, se inocularon 10 ml de cultivo de toda la noche en 500 ml de medio YT y se cultivaron las células a 37°C con agitación hasta que alcanzaron una $A_{620}=0,540$. Se enfrió el cultivo en hielo durante 30 min., se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 min. y el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 500 ml de agua esterilizada enfriada en hielo. La suspensión celular se centrifugó como anteriormente y el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 250 ml de agua esterilizada enfriada en hielo. Se centrifugó la suspensión celular de nuevo, y las células se volvieron a poner en suspensión en 10 ml de glicerol al 10%. La suspensión de glicerol se centrifugó, y las células se volvieron a poner en suspensión en 1,5 ml de glicerol al 10%, se tomaron alícuotas como muestras de 40 μ l y se almacenaron a -70°C.

Una alícuota de las células BL21 (DE3) electrocompetentes se descongeló en hielo y se añadieron aproximadamente 9 ng de ADN de DS-2150-1. Se incubaron las muestras en hielo durante 3 min., a continuación se transfirieron a una cubeta con electrodo Gene Pulser de BioRad y se sometieron a un impulso eléctrico. Se añadieron 900 μ l de SOC y la mezcla se transfirió a un tubo de cultivo donde se incubó a 37°C durante 1 hora antes de colocarse en placas con YT agar-agar que contenían 25 μ g/ml de kanamicina. La placa se incubó durante la noche a 37°C y se utilizaron colonias aisladas para los estudios de expresión.

Se cultivaron clones aislados en medio NZCYM a una $A_{600\text{ nm}}$ de aproximadamente 0,3 y se añadió lactosa al 1% para producir la expresión. Se cultivaron las células durante 4 horas, a continuación se recogieron y se analizaron por SDS PAGE. Se seleccionó el clon DS-2171-1-1 como clon representativo que expresaba grandes concentraciones de H91A Hin47.

La *E. coli* que contiene DS-2171-1-1 se cultivó en 2 matraces de 2 l que contenían 250 ml de ECGM (que contenía 8 g/l de glucosa, pH 6,5) y se incubaron agitando a 37°C durante aproximadamente 9 horas en la oscuridad a 250 rpm. El fluido del cultivo (2x250 ml) se incubó en un fermentador de 10 l y se cultivó el cultivo a 37°C. Después de aproximadamente 10 horas de incubación, se añade lactosa al 1% (concentración final) para la inducción, seguido de 4 horas más de incubación.

El fluido de cultivo se recogió en botellas esterilizadas de transferencia, se concentró y se filtró por diálisis de filtración en flujo cruzado frente al tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8,0. Se lisan las células en el concentrado utilizando un homogeneizador a alta presión (2 pasadas a 15.000 psi) para liberar la proteína Hin47 H91A. El residuo celular se

eliminó por centrifugación a 15.000 rpm durante 1,5 horas. El sobrenadante se clarificó más por centrifugación y se filtró a través de un filtro con extremo inactivo de 0,22 μ m. Los productos pueden congelarse almacenados a -70°C hasta el tratamiento posterior.

Se añadió cloruro sódico (NaCl) a la muestra clarificada hasta una concentración final de 100 mM. La muestra se purificó a continuación en una columna de cromatografía de intercambio aniónico (TMAE-Fractogel) equilibrada con Tris 50 mM pH 8,0 que contenía NaCl 100 mM. Se obtuvo la proteína H91A Hin47 en flujo a través.

Se cargó la capa acuosa en una columna cerámica de hidroxiapatito tipo 1 (CHTP-1) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM pH 8,0. Se lavó a continuación la columna con tampón de fosfato sódico 150 mM pH 8,0 y se eluyó Hin47 H91A con tampón de fosfato sódico 175 mM, pH 8,0 que contenía NaCl 1 M.

La proteína purificada Hin47 H91A se concentró utilizando una membrana del corte de peso molecular 10 kDa seguido de diafiltración con aproximadamente 10 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,5.

La proteína purificada Hin47 H91A en PBS se pasó a través de un adsorbedor con membrana Q600 sartobind. Después de pasar la solución, se regeneró la membrana utilizando KCl 1,0 M/NaOH 1,0 M seguido de lavado con KCl 1 M y equilibrando a continuación con PBS. Se repitió el proceso dos veces. La proteína Hin47 H91A concentrada diafiltrada se esterilizó por filtración a través de un filtro con membrana de 0,22 μ m. La proteína esterilizada Hin47 H91A se enriqueció con fosfato de aluminio. El concentrado purificado adsorbido se diluyó para producir la masa adsorbida a 100 μ g/ml.

Ejemplo 2

Este Ejemplo describe la preparación del componente de vacuna rHMW.

La producción y purificación de la proteína HMW se ha descrito en la solicitud de patente US n° 09/167.568 en trámite presentada el 7 de octubre de 1998.

En resumen, el plásmido pHMW1-15 (ref. 10) contiene una secuencia *Xba* I en la secuencia del activador T7 y una única secuencia *Bam*H I en la secuencia de codificación de la proteína madura HMW1A de la cepa 12 no tipificable de *Haemophilus*. El fragmento *Xba* I-*Bam*H I de 1,8 kb de pHMW1-15 se eliminó y se sustituyó por un fragmento *Xba* I-*Bam*H I de aproximadamente 114 bp generado a partir de los oligonucleótidos. El plásmido DS-1046-1-1 resultante de 11,3 kb, por lo tanto contiene el activador T7 unido en el marco con el operón *hmw*1ABC que codifica la proteína madura HMW1A de 125 kDa (Fig. 11).

El plásmido DS-1046-1-1 contiene el casete del gen *hmw*1ABC de T7 y tiene una secuencia única *Bgl* II fuera de la zona de codificación del gen HMW1A maduro. El plásmido DS-2224-1-4 contiene el gen *cer* de *E. coli* situado en un fragmento de *Bam*H I. Se aisló este fragmento y se ligó en la secuencia *Bgl* II del plásmido DS-1046-1-1 para producir el plásmido BK-35-4 (Fig. 11). El casete con resistencia a la kanamicina fue escindido de pUC 4K por la restricción *Sal* I y se ligó en el plásmido BK-35-4 restringido por *Sal* I para producir el plásmido BK-76-1-1.

Se introdujeron los plásmidos en las células BL21 (DE3) de *E. coli* por electroporación utilizando un aparato con BioRad. Se cultivaron las cepas a 37°C en medio NZCYM a una densidad óptica de $A_{578}=0,3$, a continuación fueron inducidas mediante la adición de lactosa al 1,0% durante 4 horas. Las muestras se ajustaron a una D.O. 0,2/ μ l con lisis por SDS-PAGE + tampón de carga y se cargó la misma cantidad de muestra de proteína en los geles de SDS-PAGE.

La proteína recombinante HMW se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli*, y se purificaron por el mismo procedimiento (Figura 12). Los sedimentos de las células de *E. coli* procedentes de 500 ml de cultivo se volvieron a poner en suspensión en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía NaCl 0,1 M y se descompusieron por tratamiento con ultrasonidos. El extracto se centrifugó a 20.000 g durante 30 min y se descartó el sobrenadante resultante. Se extrajo más el sedimento, en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 que contenía Triton X-100 al 0,5% y EDTA 10 mM, a continuación se centrifugó a 20.000 g durante 30 min. y se descartó el sobrenadante. Se continuó extrayendo el sedimento en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, que contenía octilglucósido al 1%, a continuación se centrifugó a 20.000 g durante 30 min. y se descartó el sobrenadante.

El sedimento resultante, obtenido después de las extracciones anteriores, contiene los cuerpos de inclusión. El sedimento se solubilizó en 6 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía guanidina 6 M y DTT 5 mM. Se añadieron doce ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a esta solución y la mezcla se centrifugó a 20.000 g durante 30 min. El sobrenadante se precipitó con polietilenglicol (PEG) 4.000 a una concentración final del 7%. El sedimento resultante se eliminó por centrifugación a 20.000 g durante 30 min. y se precipitó el sobrenadante con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una saturación del 50%. Después de la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la solución experimentó la separación de fases yendo la proteína a la fase superior, que se sometió a continuación a centrifugación a 20.000 g durante 30 min. El sedimento resultante se disolvió en 2 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía guanidina HCl 6 M y DTT 5 mM y la solución transparente se purificó en una columna de filtración con gel Superdex 200 equilibrada en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía guanidina HCl 2 M. Se analizaron las fracciones por SDS-PAGE y las que contenían la rHMW1 purificada se agruparon y se dializaron durante la noche a 4°C frente a PBS, a continuación se centrifugaron a 20.000 g durante 30 min. La proteína

ES 2 272 086 T5

permaneció soluble en estas condiciones y se añadió glicerol a la preparación de rHMW1 a una concentración final del 20% para almacenamiento a -20°C.

La concentración del componente de la vacuna rHMW se ajustó a 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en PBS (pH 7,3) y se enriqueció con fosfato de aluminio hasta una concentración final de 3 mg ml^{-1} . Se prepararon diferentes dosis diluyendo la solución madre con 3 mg ml^{-1} de fosfato de aluminio en PBS.

Ejemplo 3

Este Ejemplo describe la combinación de H91A Hin47 y rHMW como una vacuna de dos componentes.

Se prepararon las vacunas que comprendían combinaciones de H91A Hin47 y rHMW como se publica en la Tabla II siguiente:

TABLA II

$\mu\text{g rHMW} \rightarrow \mu\text{g H91A} \downarrow$	0	0,3	1,0	3,0	10	25	50	100
0		m	m	m	m	gp	gp	gp
0,3	m	m	m	m	m			
1,0	m	m	m	m	m			
3,0	m	m	m	m	m			
25	gp					gp	gp	gp
50	gp					gp	gp	gp
100	gp					gp	gp	gp
Notas: m indica que la vacuna se utilizó para inmunizar ratones. gp indica que la vacuna se utilizó para inmunizar cobayas.								

Se combinaron los componentes de la vacuna el día 0, se mezclaron durante la noche a 4°C y se tomaron alícuotas el día 1. Las vacunas combinadas se almacenaron a 4°C durante todo el periodo de inmunización.

Ejemplo 4

Este Ejemplo describe el análisis de la inmunogenicidad de las vacunas multicomponentes en animales.

Se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) grupos de cinco ratones BALB/c (Charles River, Quèbec) los días 1, 29 y 43 con una de las vacunas para ratón descritas en el Ejemplo 3. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 14, 28, 42 y 56.

Se inmunizaron por vía intramuscular (i.m.) grupos de 5 cobayas Hartley destetados (Charles River, Quèbec) los días 1, 29 y 43 con una de las vacunas para cobayas descrita en el Ejemplo 3. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 14, 28, 42 y 56.

Se determinaron los títulos de anticuerpo de IgG de Hin47 anti-H91A y de anti-rHMW por ensayos de inmunosorbente con enzima ligada (ELISA). Se cubrieron pocillos de microvaloración (NuncMAXISORB, Nunc, Dinamarca) con 50 μl de solución de proteínas (0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para H91A Hin47 o 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para rHMW). Los anticuerpos secundarios utilizados eran fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos IgG anti-ratón de cabra purificados por afinidad (específicos para Fc) o IgG de anticobaya (específicos para Fc) conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immuno-Research Labs, Mississauga, Ontario). Las reacciones se desarrollaron utilizando tetrametilbencidina (TMB/H₂O₂, ADI, Mississauga, Ontario) y se midieron las absorbancias a 450 nm (utilizando 540 nm como longitud de onda de referencia) en un lector de microplacas Flow Multiskan MCC (ICN Biomedicals, Mississauga, Ontario). El título reactivo de un antisuero se definió como la recíproca de la dilución que presenta continuamente un aumento al doble de la absorbancia sobre el obtenido con la muestra de suero preextraído.

En las Figuras 1 a 6 se ilustran los resultados de los estudios de inmunogenicidad. Como se muestra en la Figura 1, los sueros finales extraídos obtenidos de ratones inmunizados con 0,3, 1,0 ó 3,0 μg de H91 A Hin47 tenían todos títulos de anticuerpo elevados para H91 A Hin47, con independencia de la cantidad de rHMW presente (0 a 10 μg). Sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa en las respuestas primarias de Hin47 anti-H91A. Como se muestra en la Figura 2, existe un aumento de la respuesta primaria para H91A Hin47 en presencia de cantidades crecientes de rHMW. Estos descubrimientos son sorprendentes e indican que rHMW está presentando un efecto sinérgico en la respuesta inmunitaria primaria a H91A Hin47.

Como se muestra en la Figura 3, los sueros finales extraídos de la sangre extraída de ratones inmunizados con 1, 3 ó 10 μg de rHMW tenían todos un título de anticuerpo elevado para rHMW, independientemente de la cantidad de H91A Hin47 presente (0 a 3 μg). Sin embargo, a la dosis inferior de rHMW (0,3 μg), existe una inhibición estadísticamente significativa de la respuesta inmunitaria a rHMW con cantidades crecientes de H91A Hin47 añadidas. Este descubrimiento es sorprendente y sugiere que H91A Hin47 actúa como supresor inmunitario a bajas dosis de rHMW. Por el contrario, a la dosis mayor de rHMW (10 μg), la adición de H91A Hin47 aumenta de manera significativa la respuesta inmunitaria a rHMW (Fig. 4). Estos descubrimientos en los ratones, indican que cantidades relativas de los dos componentes, H91A Hin47 y rHMW son críticas para obtener una buena respuesta inmunitaria a ambos antígenos.

A partir de los datos presentados en la presente memoria, parecería que aproximadamente de 3 a aproximadamente 10 μg de rHMW, más preferentemente aproximadamente 10 μg , presentan el efecto aumentado con aproximadamente 1 a aproximadamente 3 μg de H91A Hin47.

La Figura 5 presenta los títulos de anticuerpo de Hin47 anti-H91A obtenidos en cobayas. La adición de rHMW no ejerce efecto sobre los títulos de anticuerpo de Hin47 anti-H91A. Asimismo, la adición de H91A Hin47 no ejerce ningún efecto sobre los títulos de anticuerpo anti-rHMW en cobayas (Fig. 6).

Ejemplo 5

Este Ejemplo describe la capacidad protectora de una vacuna multicomponente en modelos de animal de la enfermedad.

H91A Hin47 es parcialmente protectora en el modelo de chinchilla de otitis media, tal como se describió en la patente US nº 5.506.139 mencionada anteriormente. En este modelo, se inmunizan i.m. chinchillas de 1 a 2 años (Moulton Chinchilla Ranch, Rochester, Minnesota) los días 0, 14 y 28 con 30 μg de H91A Hin47 adsorbida en alúmina, y se sometieron a la prueba de provocación el día 44 con 50 a 350 cfu de los organismos vivos administrados en el espacio del oído medio a través de la vesícula epitimpánica (ref. 11). Los animales se controlan por timpanometría y se recoge el fluido del oído medio 4 días después de la prueba de provocación, se mezcla con 200 μl de medio BHI y las diluciones se colocan en placas de agar-agar con chocolate que se incuban durante 24 h a 37°C. Los animales convalecientes o los pseudoinmunizados con alúmina sola, se utilizan como referencias. Para el estudio de la vacuna multicomponente, se mezclan 50 μg de H91A Hin47 con 50 μg de rHMW como se describe en el Ejemplo 3 y las chinchilla se inmunizaron tal como se describió. Los resultados del estudio de protección se presentan en la Figura 7 que indican que existe una protección parcial proporcionada en el modelo de la prueba de provocación intravesicular mediante la combinación de H91A Hin47 - rHMW.

Se ha demostrado en chinchillas jóvenes que la colonización nasofaríngea con *H. influenzae* no tipificable conduce a otitis media (ref. 14). rHMW es parcialmente protectora en un modelo de prueba de provocación de colonización nasofaríngea de chinchilla, descrito en el documento WO 00/20609 mencionado anteriormente. En este modelo, se inmunizan i.m. animales los días 0, 14 y 28 con 25, 50 ó 100 μg de rHMW adsorbida en alúmina, y la prueba de provocación el día 44 con 10^8 cfu de bacterias vivas suministradas por vía intranasal (50 μl por los orificios nasales).

El lavado nasofaríngeo se realiza 4 días después de la prueba de provocación utilizando 1 ml de solución salina esterilizada como lavado. Se colocan 25 μl de lavado en agar-agar con chocolate en presencia de estreptomycin y las placas se incuban a 37°C durante 24 h. (La cepa de la prueba de provocación se hizo resistente a la estreptomycin por atenuación en serie, a fin de facilitar la cuantificación de las bacterias recuperadas en presencia de la flora natural que es destruida por la estreptomycin). Los animales convalecientes o los que fueron pseudoinmunizados con alúmina sola, se utilizan como referencias. Para el estudio de la vacuna multicomponente, se mezclaron 50 μg de rHMW con 50 μg de H91A Hin47 como se describe en el Ejemplo 3 y se inmunizaron las chinchillas tal como se describe. Los resultados del estudio de protección se presentan en la Figura 8 que indica que existe todavía excelente protección proporcionada en el modelo de la prueba de provocación de colonización nasofaríngea mediante la combinación de H91A Hin47 + rHMW.

Ejemplo 6

Este Ejemplo describe el análisis de la estabilidad de la vacuna de dos componentes.

La H91A Hin47 adsorbida (400 μg de proteína + 3 mg de fosfato de aluminio por ml) y rHMW (400 μg de proteína + 3 mg de fosfato de alúmina por ml) se mezclaron 1:1 hasta una concentración final de 100 μg de cada proteína + 3 mg de fosfato de alúmina por ml como se describe en el Ejemplo 3. Las proteínas H91A Hin47 y rHMW adsorbidas de forma individual se ajustaron también a una concentración final de 100 μg de proteína + 3 mg de fosfato de aluminio/ml. Las muestras se almacenaron a 4°C y se tomaron alícuotas de 0,5 ml el día 0 y cada dos semanas para análisis por SDS-PAGE. Se microcentrifugaron las alícuotas a 10.000 rpm durante 10 min para separar el sobrenadante del sedimento de alúmina. Se disolvió el sedimento en tampón de muestra de SDS-PAGE y el sobrenadante se precipitó en primer lugar con acetona, después se disolvió en tampón de muestra de SDS-PAGE. Se

analizaron cantidades equivalentes de sobrenadante y sedimento suponiendo que la proteína se adsorbía al 100% o no se adsorbía. En la Fig. 9 se presentan los resultados del estudio de estabilidad los cuales indican que después de dos semanas, no existe degradación de las proteínas y ambas son todavía completamente adsorbidas en la alúmina.

Ejemplo 7

Este Ejemplo ilustra la respuesta inmunitaria para administración conjunta de la vacuna de *H. influenzae* de dos componentes con Pentacel®.

Se inmunizaron i.m. grupos de 5 cobayas Hartley (Charles River, Quèbec) los días 1 y 21 con una vacuna de dos componentes H91A Hin47 + rHMW, vacuna Pentacel (vacuna comercial de Connaught Laboratories Limited que contiene PT + FHA + 69 kDa + Aggs en pesos de 20:20:5:3 µg; toxoide diftérico a 15 Lf; toxoide tetánico a 5 Lf; IPV que contiene los tipos 1, 2 y 3 de poliovirus inactivado a 40, 8 y 32 unidades de D-antígeno respectivamente; 10 µg de conjugado PRP-T de polisacárido de tipo B de *H. influenzae* conjugado con toxoide tetánico a 20 µg) o vacuna de dos componentes H91A Hin47 + rHMW + Pentacel. La vacuna de dos componentes contenía 50 µg de cada uno de H91A Hin47 y rHMW. Los animales recibieron las vacunas de dos componentes + Pentacel se les inyectó en ambas ijadas. Se extrajeron muestras de sangre el día 1, antes de la inyección y después el día 28.

Se determinaron los títulos de anticuerpo IgG anti-H91A Hin47 y anti-rHMW por ELISA como se describe en el Ejemplo 4. Los títulos de anticuerpo IgG del componente anti-Pentacel fueron determinados por ELISA, esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 4. Se recubrieron placas de microvaloración con 5 µg ml⁻¹ de antígeno para PT, FHA 69 kDa, Aggs y PRP; la dilución 1/20 de 2,5 Lf ml⁻¹ para toxoide diftérico; 1,3 Lf ml⁻¹ de toxoide tetánico; dilución 1/50 de 25,6 EU ml⁻¹ de polio tipo 1; o dilución 1/50 de 15,1 EU ml⁻¹ de polio tipo 2. No pudo demostrarse una relación de señal a ruido para la polio tipo 3. El anticuerpo secundario utilizado fue fragmentos F(ab)₂ de IgG (H+L) anticobaya de mono conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immuno Research Labs). Las referencias negativas fueron los sueros preextraídos o el antisuero contra un antígeno irrelevante del RSV. Los resultados se observan en las Figuras 10A y 10B.

Sumario de la exposición

En el sumario de esta exposición, la presente invención proporciona una vacuna multicomponente contra *Haemophilus influenzae* que presenta un amplio espectro de eficacia y que comprende dos antígenos diferentes de *Haemophilus influenzae* como se ha descrito anteriormente.

Referencias

1. Barbour, M.L., R.T. Mayon-White, C. Cole, D.W.M. Crook, and E.R. Moxon. 1995. The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect. Dis.* 171:93-98.
2. Berkowitz et al. 1987. *J. Pediatr.* 110:509.
3. Claesson et al. 1989. *J. Pediatr.* 114:97.
4. Black, S.B., H.R. Shinefield, B. Fireman, R. Iliatt, M. Polen, E. Vittinghoff, The Northern California Kaiser Permanent Vaccine Study Center Pediatrics Group. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjug.) *Haemophilus influenzae* type b (HBOC) vaccine in a United States population of 61,080 children. 1991. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10:97-104.
5. Nitta, D.M., M.A. Jackson, V.F. Burry, and L.C. Olson. 1995. Invasive *Haemophilus influenzae* type f disease. *Pediatr. Infect. Dis J.* 14:157-160.
6. Waggoner-Fountain, L.A., J.O. Hendley, E. J. Cody, V.A. Perriello, and L.G. Donowitz. 1995. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and t as significant pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 21:1 122-1324.
7. Madore, D.V. 1996. Impact of immunization on *Haemophilus influenzae* type b disease. *Infectious Agents and Disease* 5:8-20.
8. Bluestone, C.D. 1982. Current concepts in otolaryngology. Otitis media in children: to treat or not to treat? *N. Engl. J. Med.* 306:1399-1404.
9. Barenkamp, S.J., and F.F. Bodor. 1990. Development of serum bactericidal activity following non-typable *Haemophilus influenzae* acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis.* 9:333-339.
10. Barenkamp, S.J., and J.W. St. Geme III. 1994. Genes encoding high-molecular weight adhesion proteins of non-typeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect. Immun.* 62:3320-3328.

11. St. **Geme III** J.W., V.V. **Kumar**, D. **Cutter**, and S.J. **Barenkamp**. 1998. Prevalence and distribution of the hmw and hia genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 66:364-368.

12. St. **Geme III**, J.W., S. **Falkow**, and S.J. **Barenkamp**. 1993. High-molecular-weight proteins of non-typeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2875-2879.

13. **Barenkamp**, S.J. 1996. Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of non-typeable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect. Immun.* 64:1246-1251.

14. **Yang**, Y.P., S.M. **Loosmore**, B. **Underdown**, and M.H. **Klein**. 1998. Nasopharyngeal colonization with nontypeable *H. influenzae*, in chinchillas. *Infect. Immun.* 66:1973-1980.

15. **Young** and **Davis**, 1985, *Gene* 38: 31 a 38.

16. **Retzlaff**, C., Y. **Yamamoto**, P.S. **Hoffman**, H **Friedman**, and T.W. **Klein**. 1994. Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. *Infect. Immun.* 62:5689-5693.

17. **Loosmore**, S.M., Y-P. **Yang**, R. **Oomen**, J.M. **Shortreed**, D.C. **Coleman**, and M.H. **Klein**. 1998. The *Haemophilus influenzae* HtrA protein is a protective antigen. *Infect. Immun.* 66:899-906.

18. **Holmes**, D.S. and **Quigley**, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunógena para conferir protección en un huésped contra la enfermedad producida por *Haemophilus influenzae*, que comprende:

25 a 100 μg de un análogo de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* que presenta una actividad de proteasa disminuida que es inferior a aproximadamente 10% de la de la proteína Hin47 de tipo salvaje, y 25 a 100 μg de una proteína de alto peso molecular (HMW) de una cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho análogo de la proteína Hin47 es aquel en el que por lo menos un aminoácido de la proteína Hin 47 de tipo salvaje que contribuye a la actividad de proteasa se ha eliminado o sustituido por un aminoácido diferente y que tiene sustancialmente las mismas propiedades inmunógenas que la proteína Hin47 de tipo salvaje.

3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho por lo menos un aminoácido se selecciona de entre los aminoácidos 91, 121 y 195 a 201 de la proteína Hin47 de tipo salvaje.

4. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho análogo de la proteína Hin47 es aquel en el que la serina-197 se sustituye por alanina; la histidina-91 se sustituye por alanina, o por lisina o arginina; o Asp-121 se sustituye por alanina.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha proteína HMW es una proteína HMW1 o HMW2 de una cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae*, produciéndose dicha proteína HMW de manera recombinante o de otra manera.

6. Composición según la reivindicación 5, en la que dichas proteínas HMW1 y HMW2 proceden de las cepa respectiva de *Haemophilus influenzae* no tipificable y poseen los pesos moleculares respectivos indicados a continuación:

Cepa de <i>H. influenzae</i> no tipificable		12	JoyC	K21	LCDC2	PMH1	15
Proteína madura:	HMW1	125 kD	125,9 kD	104,4 kD	114,0 kD	102,4 kD	103,5 kD
	HMW2	120 kD	100,9 kD		111,7 kD	103,9 kD	121,9 kD

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y que comprende hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio u otro adyuvante.

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y que comprende como por lo menos un componente antigénico adicional para conferir protección contra la infección producida por otro patógeno, (i) toxoide diftérico, (ii) toxoide tetánico, (iii) toxoide de la tos ferina, hemoaglutinina filamentosa, pertactina y aglutinógenos; (iv) poliovirus no virulento; (v) PRP-T o (vi) uno o varios otros compuestos antigénicos para conferir dicha protección.

9. Composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su utilización como vacuna.

Títulos del anticuerpo anti-H91A Hin47 en ratones

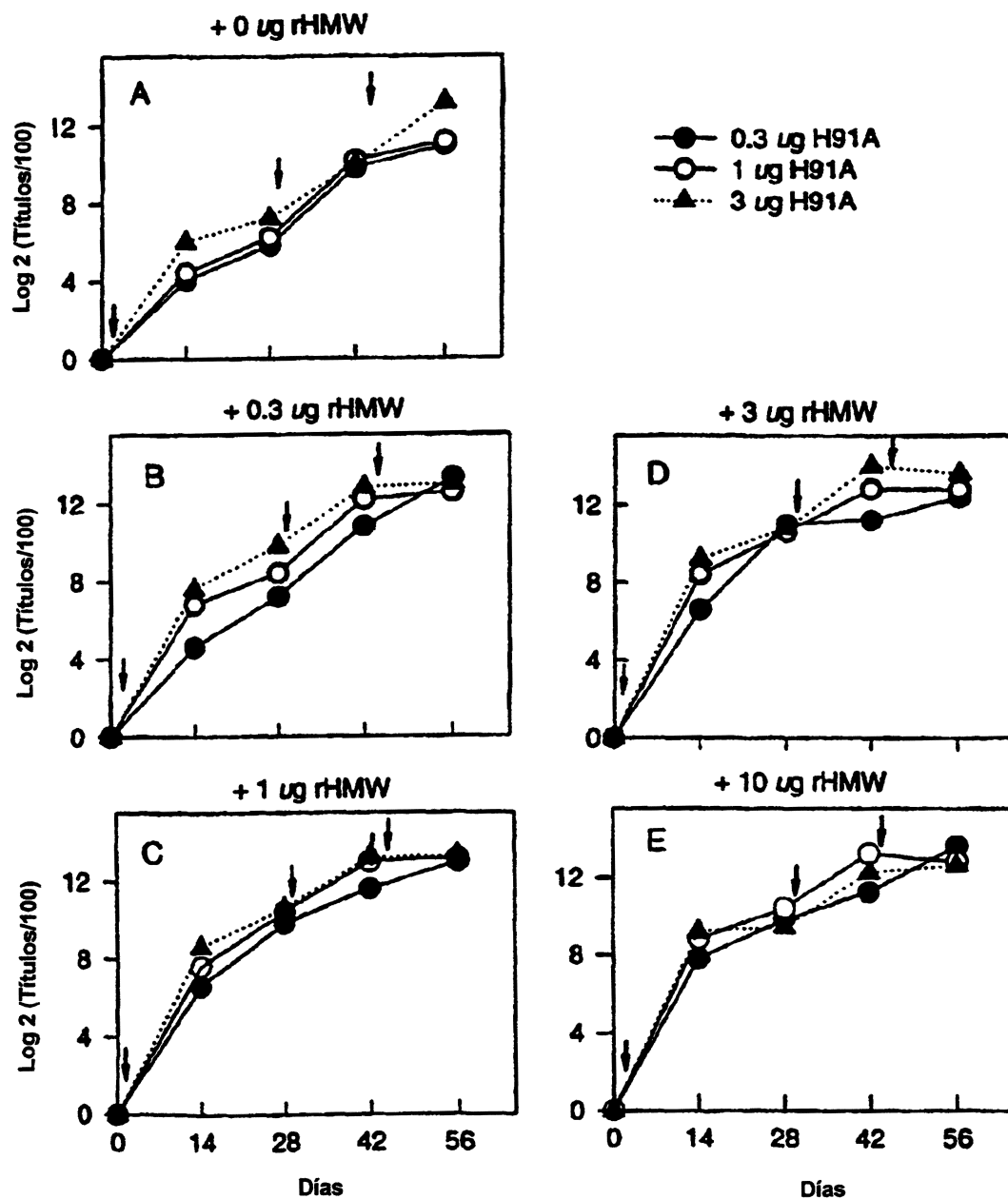
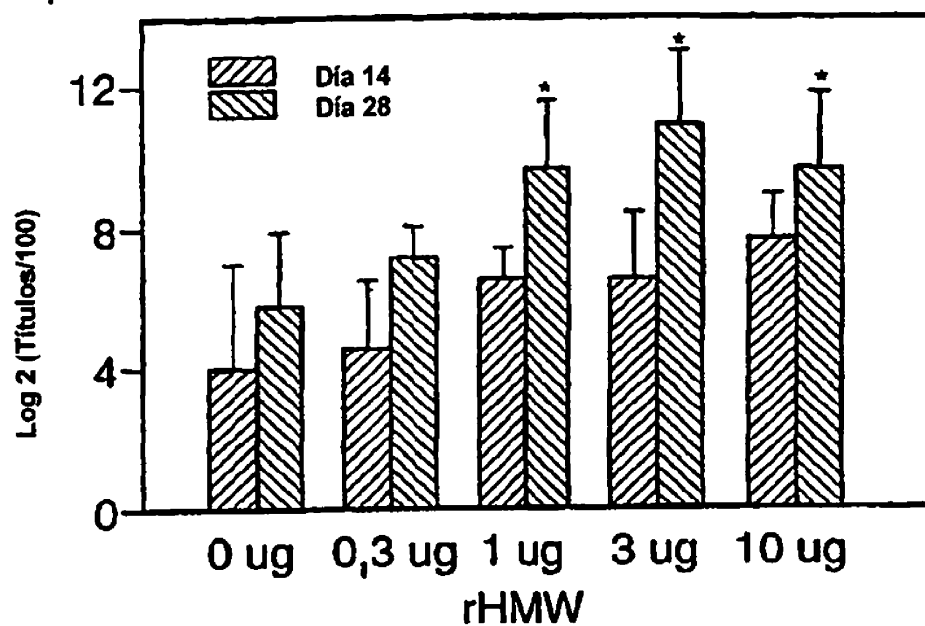


FIG. 1

Respuestas del anticuerpo anti-H91A Hin47 primario en ratones



Se inmunizaron grupos de 5 ratones con 0,3 µg de H91A Hin47 el día 1 en presencia de varias cantidades de rHMW. Se extrajeron muestras de sangre los días 14 y 28.

* Se observó significación estadística al comparar el grupo de referencia por la prueba de la t de Student

FIG.2

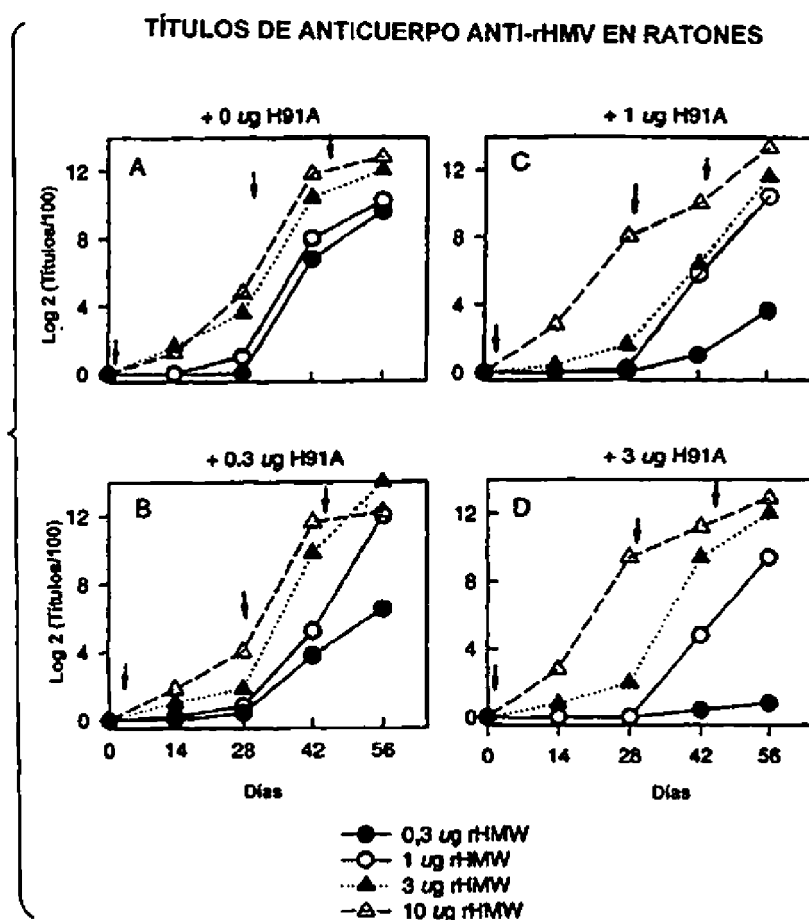
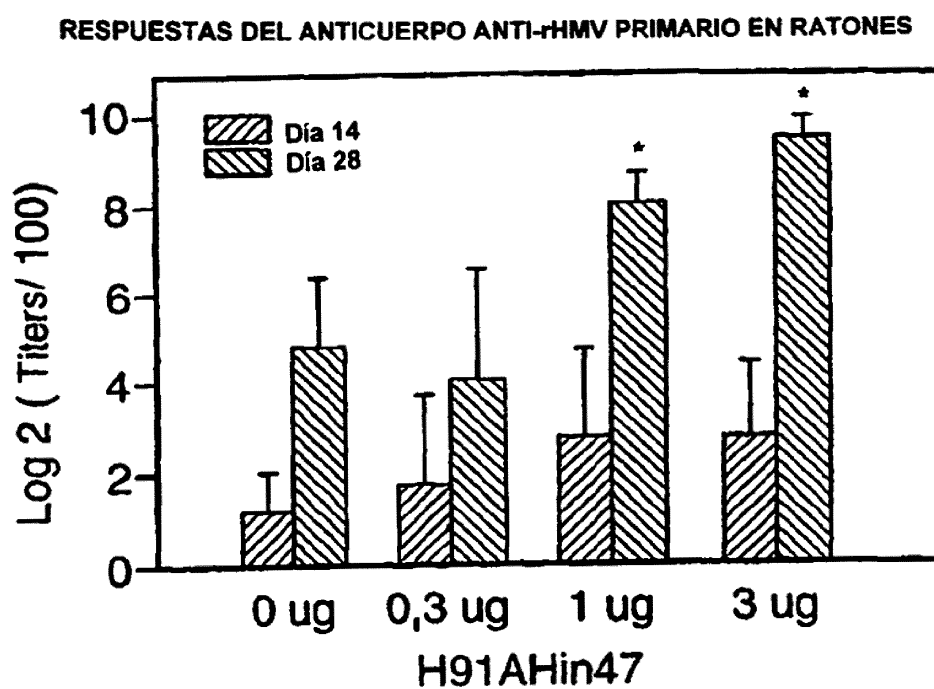


FIG. 3



Se inmunizaron grupos de 5 ratones con 10 μ g de rHMV el día 1 en presencia de varias cantidades de H91A Hin47. Se extrajeron muestras de sangre los días 14 y 28

* Se observó significación estadística al comparar el grupo de referencia por la prueba de la t de Student

FIG.4

Títulos del anticuerpo anti-H91A Hin47 en cobayas

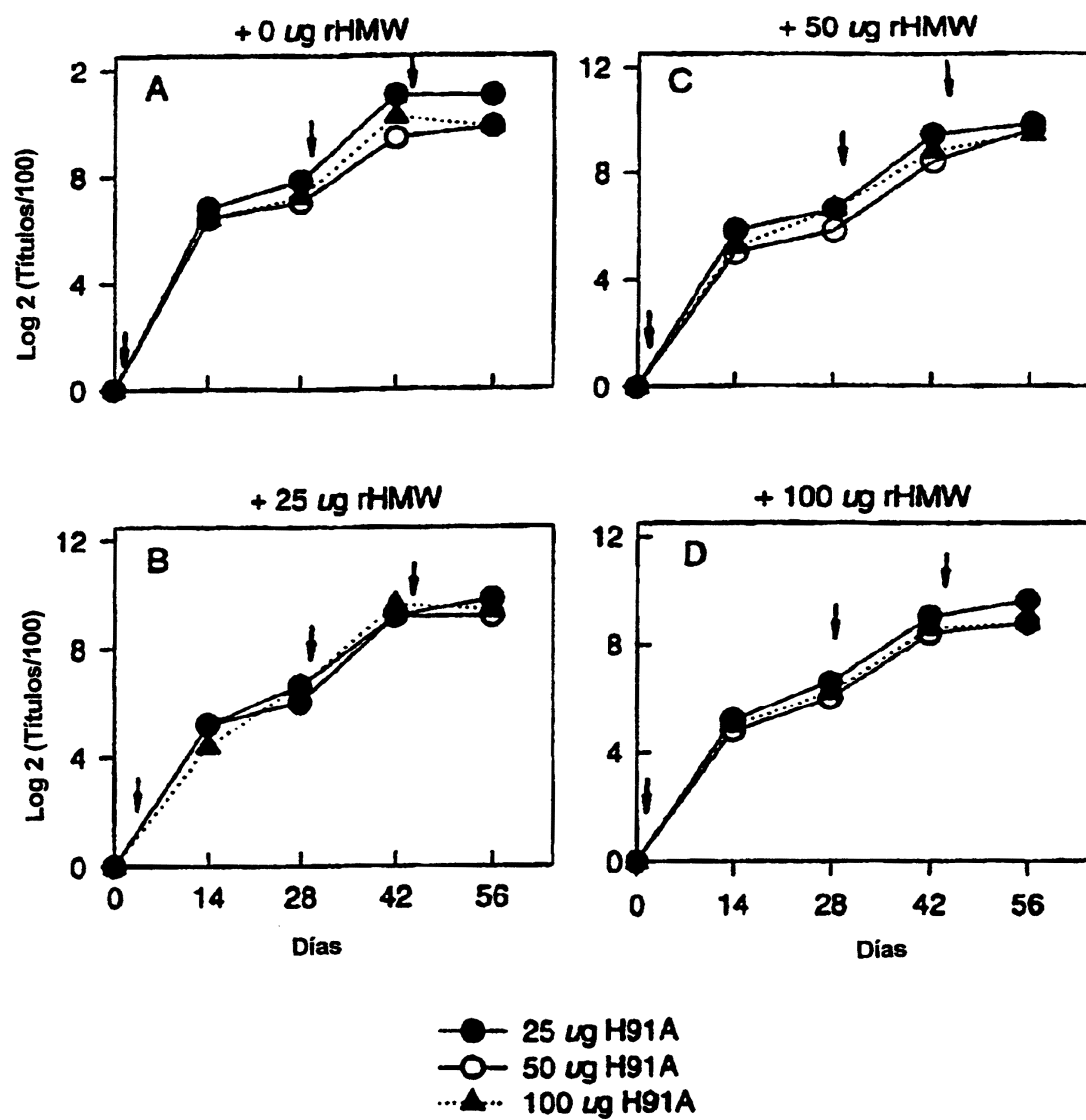


FIG. 5

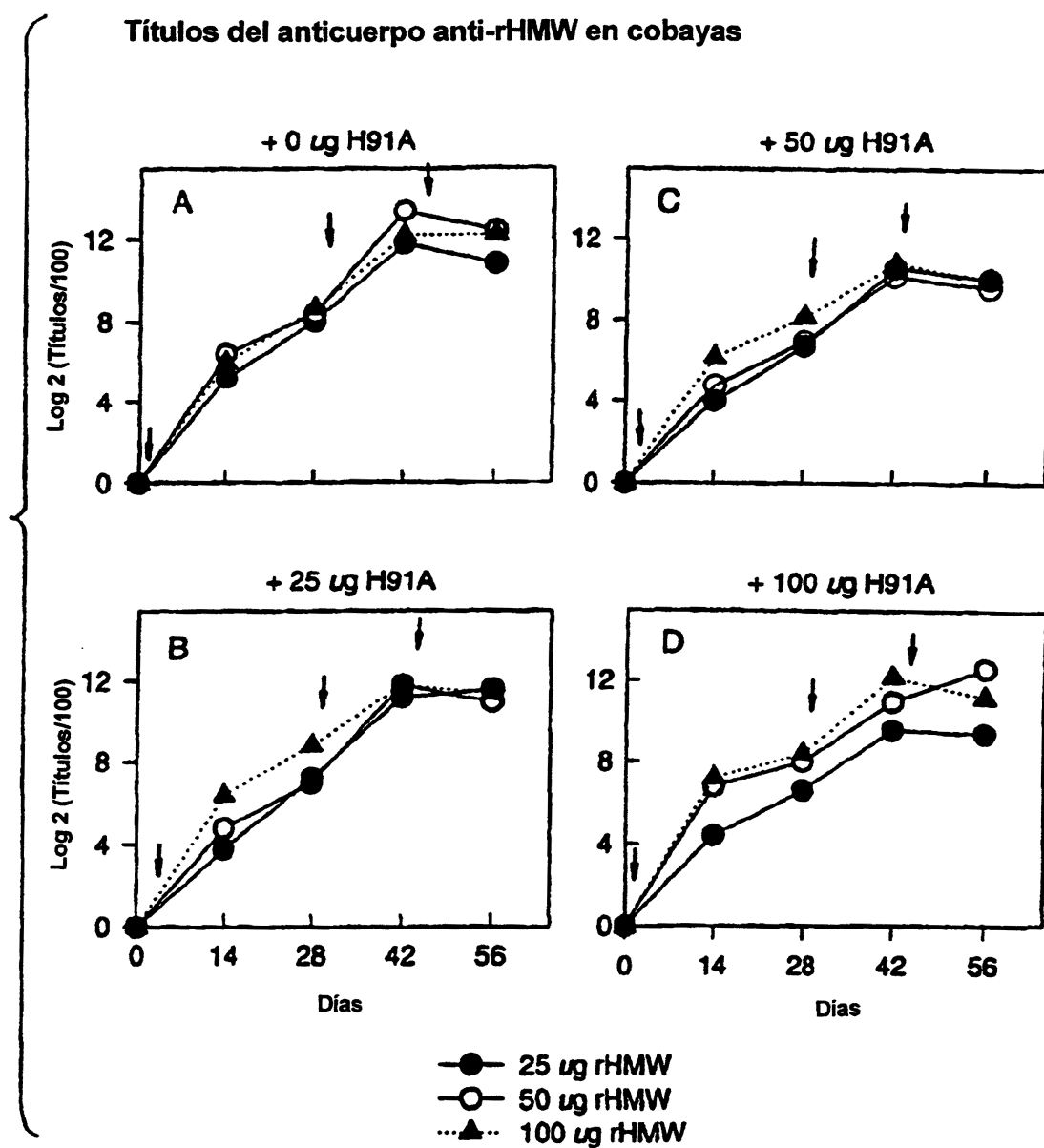


FIG. 6

Capacidad protectora de una vacuna de H, influenzae de dos componentes frente a la prueba de provocación intravesicular con la capa 12 de NTHi en chinchillas

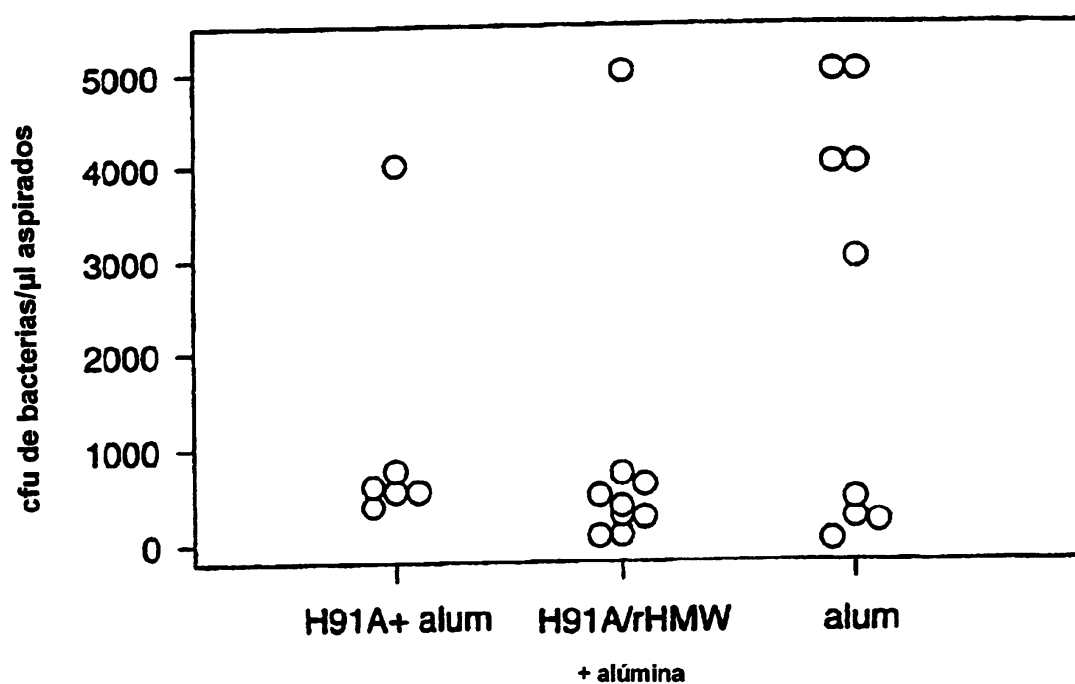


FIG. 7

Capacidad protectora de una vacuna de H, influenzae de dos componentes frente a la colonización de NP con la capa 12 de NTHi en chinchillas

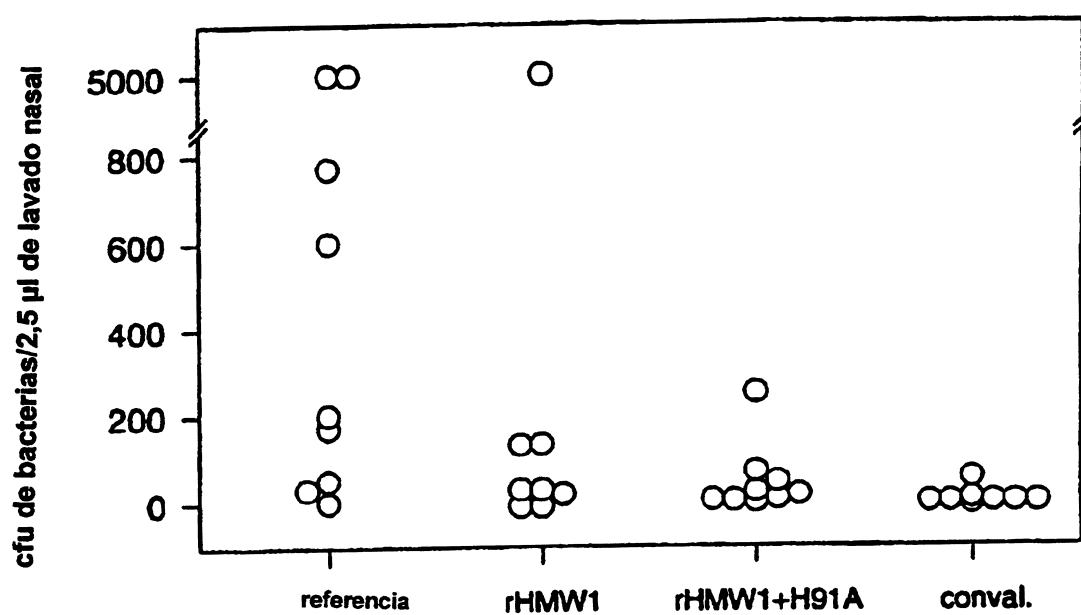
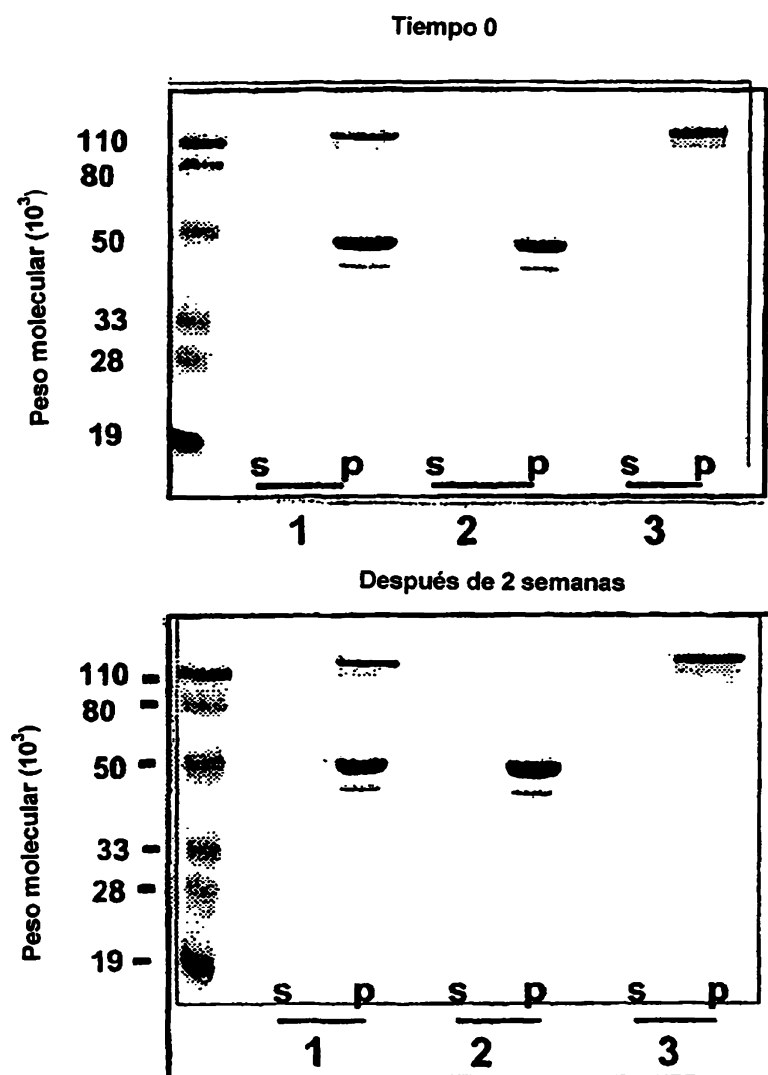


FIG. 8

Estabilidad de H91AHin47 y rHMW absorbidas en alúmina:



1. H91AHin47 + rHMW

2. H91AHin47

3. rHMW

s. Sobrenadante de suspensión de alúmina

p. Proteínas adsorbidas en sulfato de alúmina

FIG. 9

Títulos del anticuerpo anti-H91A y HMW1 en cobayas

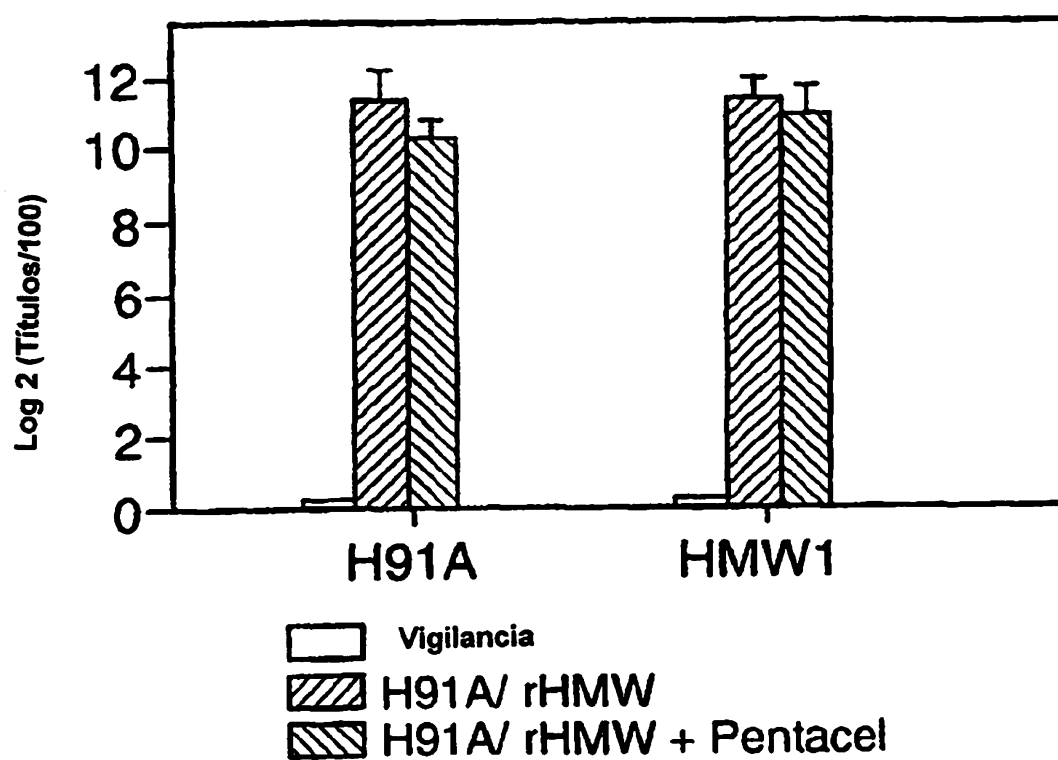


FIG.10a

Títulos del anticuerpo del componente anti-Pentacel en cobayas

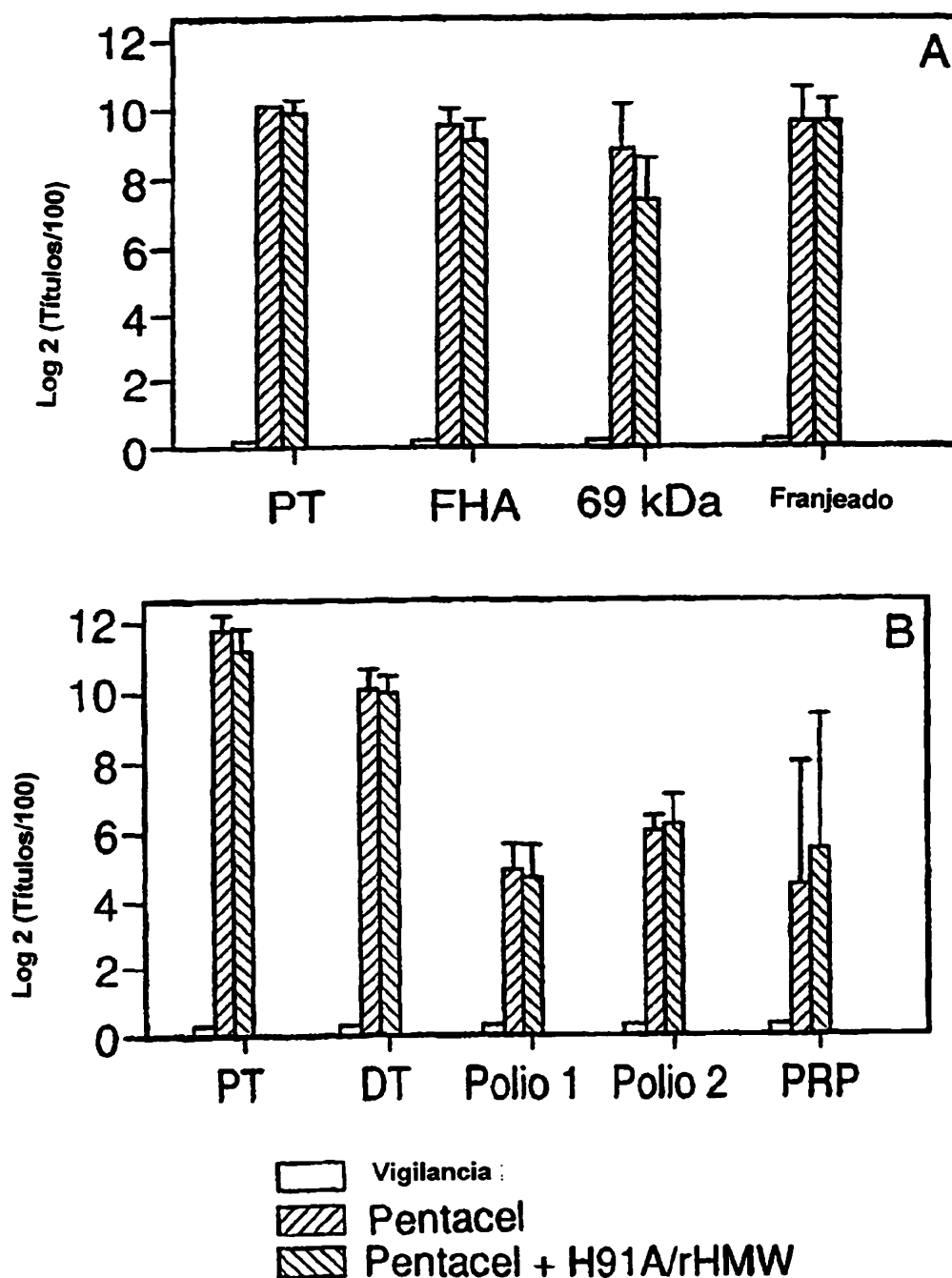


FIG.10b

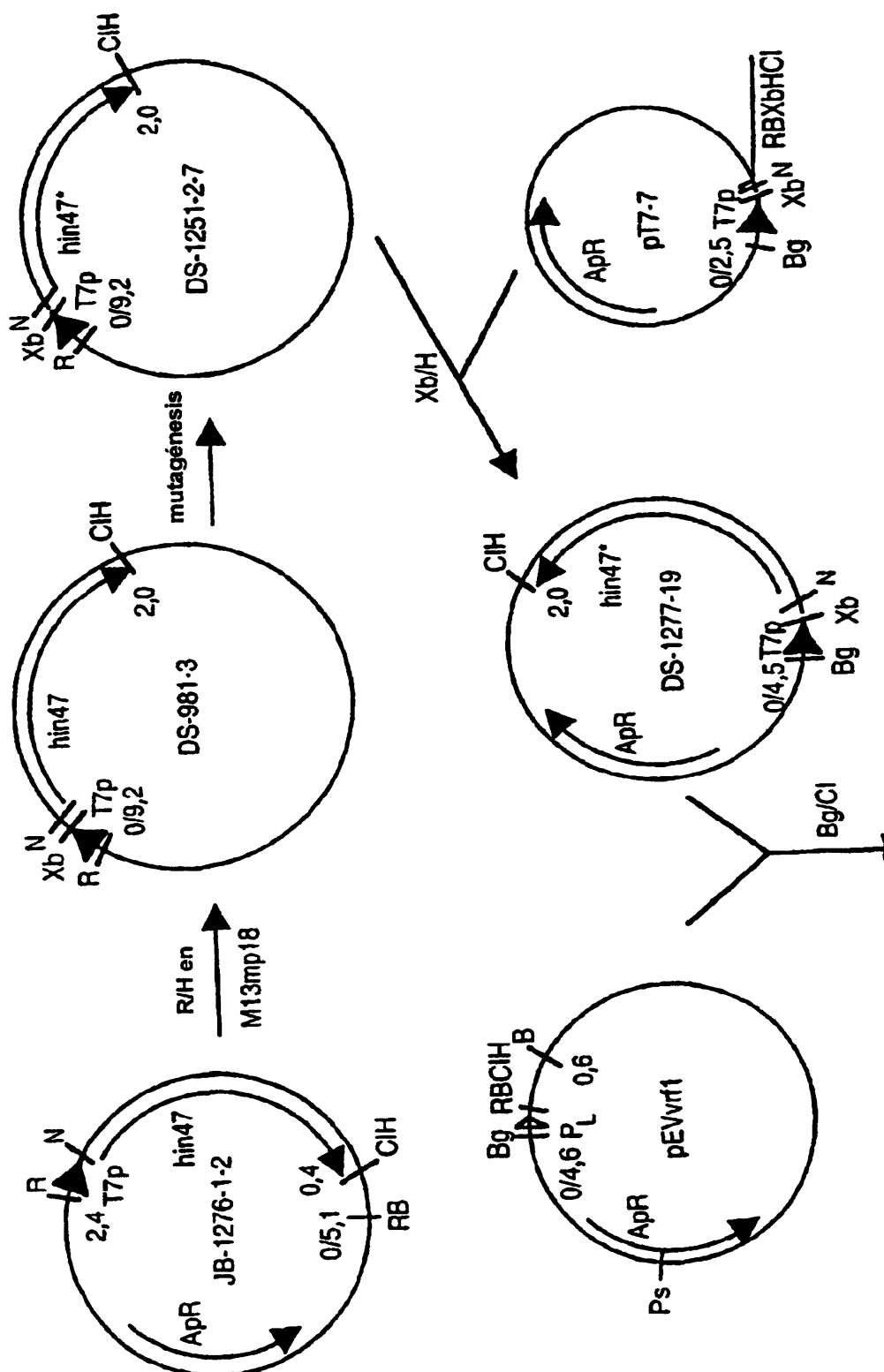


FIG.11a

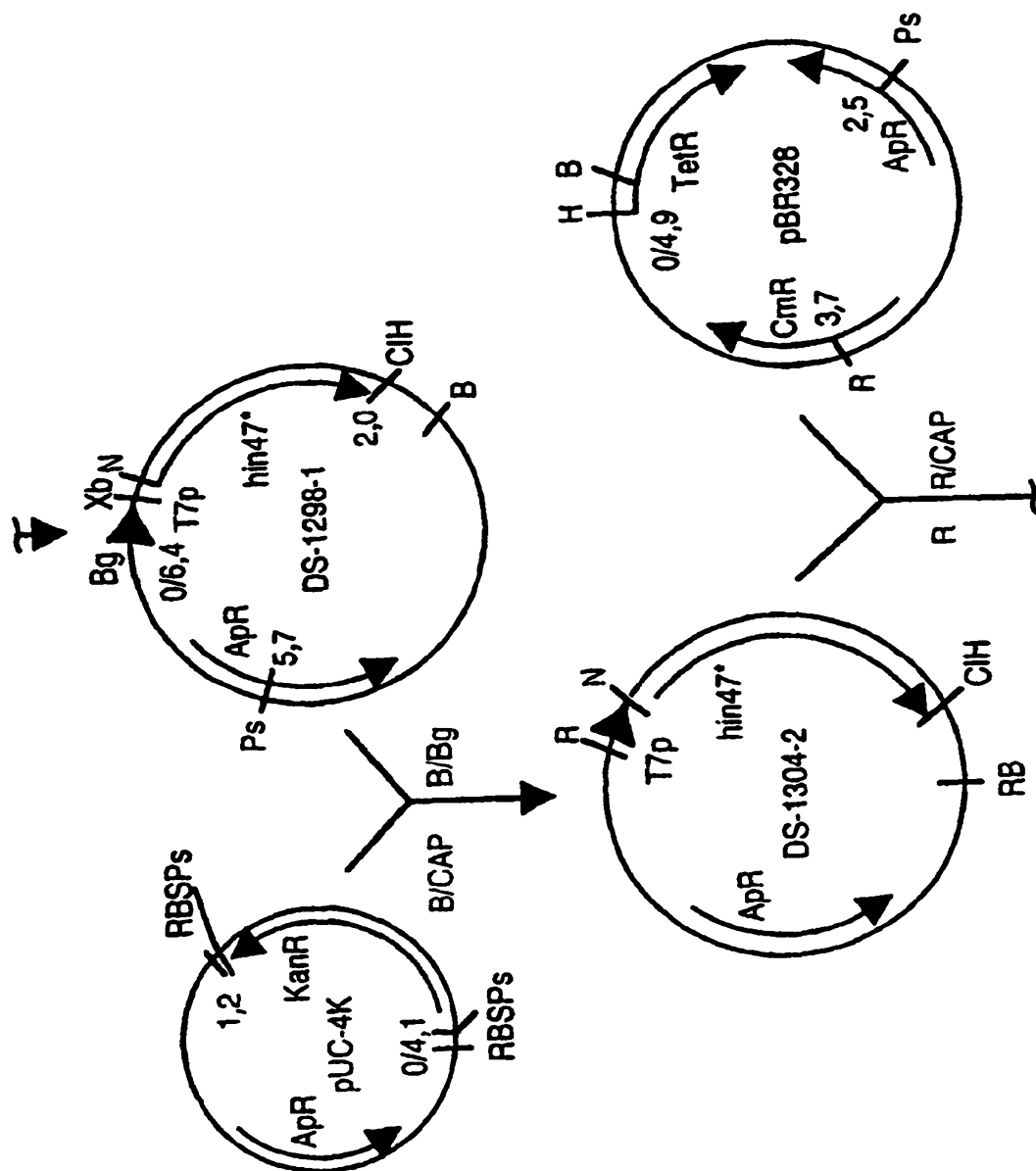
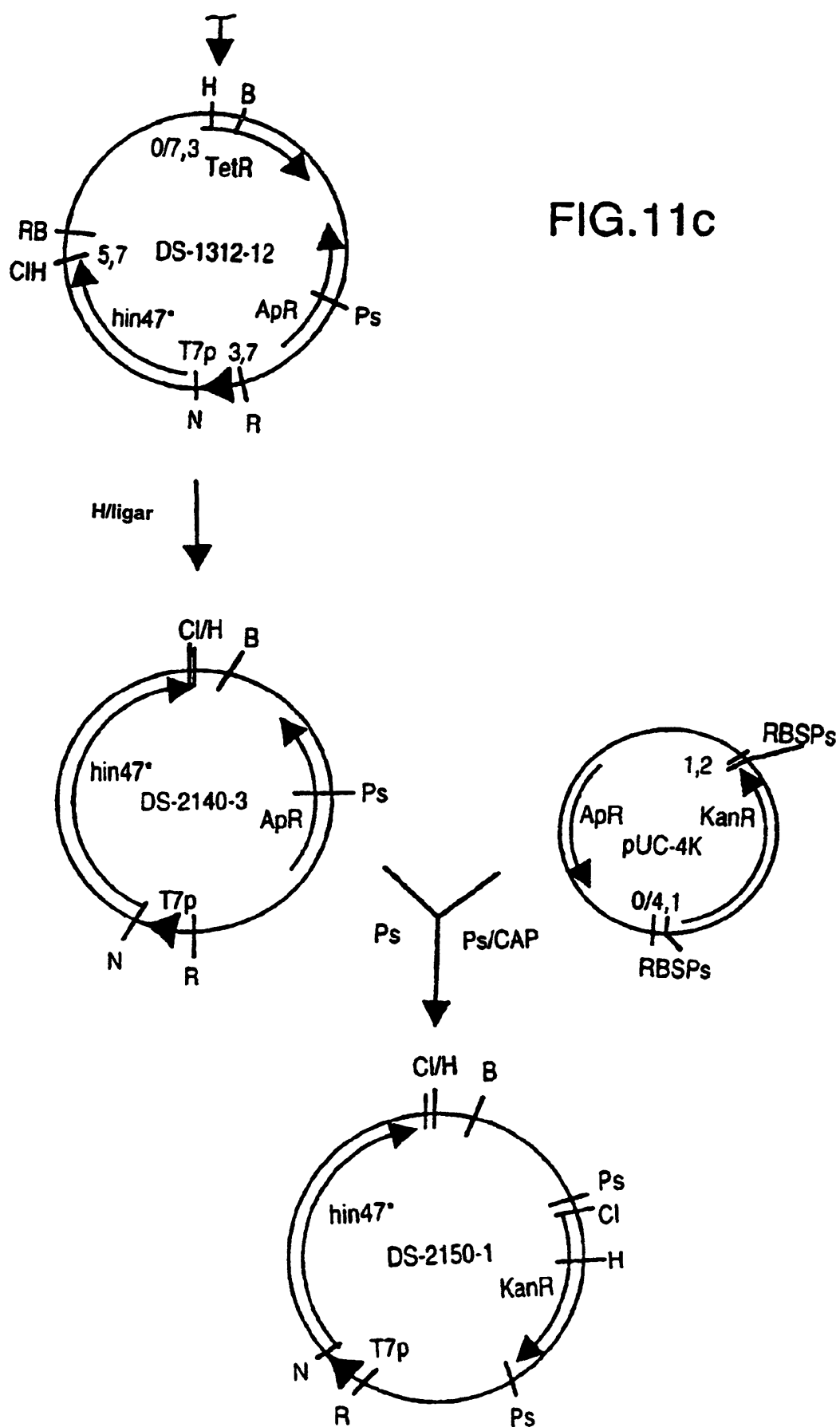


FIG.11b



Digestión con pHMW1-15Xb/B
Oligo Xb- B para eliminar la secuencia
contigua 5' y la secuencia mayor

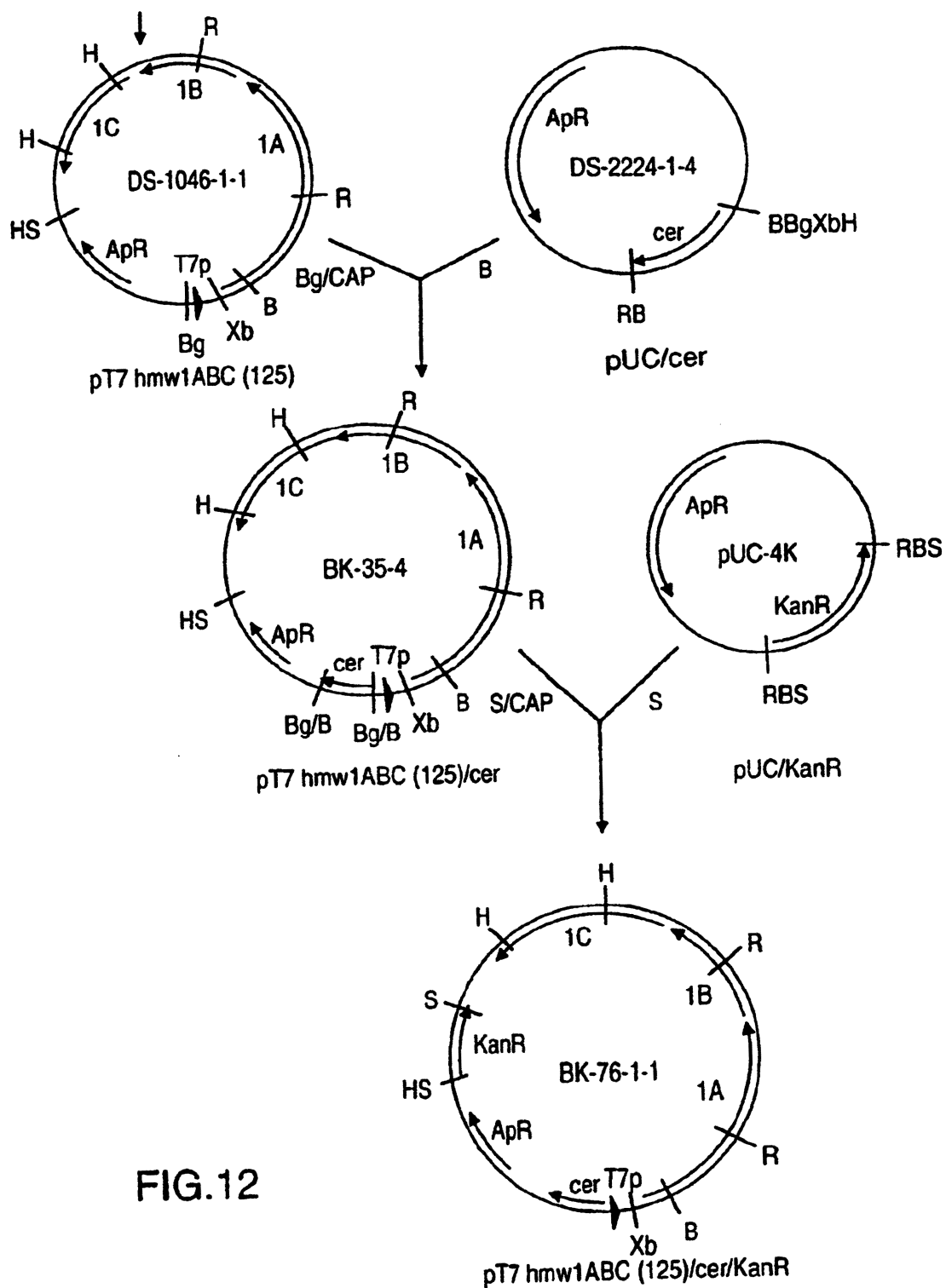


FIG.12