



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 280 230**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/116 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00945494 .3**
(86) Fecha de presentación : **11.07.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1200122**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

(54) Título: **Vacuna multicomponente para la protección contra la enfermedad provocada por *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.**

(30) Prioridad: **15.07.1999 US 353617**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

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

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 280 230 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

Vacuna multicomponente para la protección contra la enfermedad provocada por *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la vacunología y, en particular, a una vacuna multicomponente que comprende proteínas recombinantes de *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

Antecedentes de la invención

Haemophilus influenzae es la causa de varias enfermedades humanas graves, tales como la meningitis, la epiglotitis, la septicemia y la otitis media. Existen seis serotipos de *H. influenzae*, denominados a a f, que están identificados por su polisacárido capsular. *H. influenzae* de tipo b (Hib) era la causa principal de la meningitis bacteriana hasta la introducción de varias vacunas conjugadas de Hib en la década de los 80 (ref. 1). A lo largo de la solicitud, se citan varias referencias entre paréntesis para describir con mayor detalle el estado de la técnica al que se refiere la presente invención. Toda la información bibliográfica para cada cita se encuentra al final de la memoria, inmediatamente antes de las reivindicaciones). Las vacunas basadas en el polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo b conjugado con el toxoide diftérico (ref. 2), el toxoide tetánico (ref. 3 y patente US n° 4.496.538) o la proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (ref. 4) han sido eficaces para reducir la meningitis producida por *H. influenzae* de tipo b. Los demás serotipos de *H. influenzae* están asociados a la enfermedad invasiva con bajas frecuencias, aunque parece existir un aumento en la frecuencia de la enfermedad causado por estas cepas ya que la incidencia de la enfermedad por Hib disminuye (refs. 5 y 6). *H. influenzae* no encapsulada o no tipificable (NTHi) son también responsables de una amplia gama de enfermedades humanas que incluyen la otitis media, la epiglotitis, la neumonía y la traqueobronquitis. La frecuencia de la enfermedad producida por NTHi no se ha visto afectada por la introducción de las vacunas con Hib (ref. 7).

La otitis media es la enfermedad más frecuente de la primera infancia, con 60 a 70% de todos los niños menores de 2 años de edad, que experimentan entre una y tres infecciones de oído (ref. 8). La otitis crónica media es responsable de deficiencias auditivas, de habla y cognitivas en los niños. Las infecciones por *H. influenzae* totalizan aproximadamente el 30% de los casos de otitis aguda o media y aproximadamente 60% de otitis crónica media. Las infecciones por *M. catarrhalis* totalizan otro 15 a 20% de otitis aguda media. Únicamente en los Estados Unidos, el tratamiento de la otitis media cuesta entre 1 y 2 billones de dólares al año en antibióticos y procedimientos quirúrgicos tales como amigdalectomías, adenoidectomías e inserción de tubos de timpanostomía. Se estima que otros 30 billones de \$ se gastan al año en terapias asociadas tales como logopedia y clases especiales de educación. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* es la tercera causa más frecuente de otitis media y de sinusitis en los niños, responsables del 15 al 20% de la enfermedad. Se ha asociado también a la enfermedad del aparato respiratorio inferior en niños y adultos, incluyendo la neumonía y la bronquitis crónica y con menos frecuencia puede producir bacteremia y meningitis (refs. 9, 10 y 11). No hay vacunas disponibles para proteger contra la enfermedad por *M. catarrhalis*. Además, muchos de los organismos causantes de la otitis media se están volviendo resistentes al tratamiento con antibióticos. Por lo tanto es muy deseable una vacuna profiláctica eficaz contra la otitis media.

Durante la infección natural, las proteínas de la membrana externa expuestas en superficie que estimulan una respuesta al anticuerpo son en potencia importantes dianas para anticuerpos bactericidas y/o protectores y por consiguiente potenciales candidatos de vacunas. Barenkamp y Bodor (ref. 12) demostraron que los sueros de niños convalecientes que padecen otitis media debida a NTHi, contenían anticuerpos contra proteínas de alto peso molecular (HMW). Aproximadamente del 70 al 75% de las cepas de NTHi expresa las proteínas HMW y la mayoría de estas cepas contienen dos grupos génicos denominados *hmw1ABC* y *hmw2ABC* (refs. 13 y 14). Se ha demostrado que las proteínas HMWA son adhesinas que median el acoplamiento a las células epiteliales humanas (ref. 15). La inmunización con una mezcla de proteínas naturales HMW1A y HMW2A produjo la protección parcial en el modelo de prueba de prolongación intravesicular en chinchilla de la otitis media (ref. 16).

La patente US n° 5.603.938 (Barenkamp), concedida a la St. Louis University y a la 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 procedente de *Haemophilus* no tipificable de peso molecular comprendido entre aproximadamente 120 y 125 kDa que se encuentran en las cepas no tipificables de *Haemophilus*. Las proteínas HMW están ausentes en las cepas encapsuladas de *Haemophilus*.

La producción de proteínas HMW naturales de cepas de *H. influenzae* es muy baja y un método para producir proteínas HMW recombinantes (rHMW) protectoras se ha descrito en el documento WO 00/20609, publicado el 13 de abril de 2000, cedido a su cesionario. Se ha desarrollado específicamente un modelo de colonización nasofaríngea de chinchilla para demostrar la eficacia de la vacuna de las adhesinas (ref. 17) y las proteínas rHMW son protectoras en este modelo, tal como se describe en el documento WO 00/20609 mencionado anteriormente. Se demuestra que las proteínas rHMW1A y rHMW2A proporcionan una protección equivalente a cada una de las demás y la proteína rHMW1A se seleccionó para posteriores estudios de la vacuna. En esta solicitud, rHMW se refiere a HMW1A recombinante procedente de la cepa 12 de NTHi, aunque la proteína HMW1A recombinante correspondiente procedente de otras cepas de NTHi y la proteína rHMW2A correspondiente procedente de las cepas NTHi pueden utilizarse. Pueden utilizarse las proteínas naturales correspondientes.

Una segunda familia de proteínas de adhesión de peso molecular alto se ha identificado en aproximadamente el 25% de NTHi y en las cepas de *H. influenzae* encapsuladas (refs. 18, 19 y 20). La patente US nº 5.646.259 (St. Geme, III *et al.*), concedida a la St. Louis University y a la Washington University, describe la clonación, expresión y las secuencias de los genes que codifican las que se denominan en la presente memoria proteínas HA1 y HA2, que

5 presentan homología limitada a las proteínas HMW1 y HMW2 de la patente US nº 5.603.938.

El miembro NTHi de esta segunda familia se denomina adhesina de *Haemophilus influenzae* o Hia (HA1) y la proteína homóloga encontrada en cepas encapsuladas se denomina proteína fibrilar de superficie de *Haemophilus influenzae* o Hsf (HA2). El gen *hia* se clonó originalmente en un banco de expresión que utiliza sueros de un paciente

10 convaleciente de otitis media, lo que indica que es un inmunógeno importante durante la enfermedad. El prototipo de proteínas Hia y Hsf demuestra aproximadamente 82% de similitud de secuencia, aunque la proteína Hsf es considerablemente mayor. Las proteínas se componen de terminales amino y carboxi conservados y varios motivos de repetición con Hsf que contiene más secuencias repetidas que Hia.

15 Las versiones completas y truncadas en el terminal N de la proteína Hia (rHia) en *E. coli* protegen contra la bacteremia causada por organismos de *H. influenzae* de tipo a y tipo b, y proporcionan protección parcial contra la colonización nasofaríngea por *H. influenzae* no tipificable. En esta solicitud, rHia se refiere a V38 rHia de la cepa 11 de NTHi, aunque pueden utilizarse otras proteínas Hia completas y truncadas en el terminal N recombinantes procedentes de otras cepas de NTHi. Pueden utilizarse asimismo las correspondientes proteínas naturales.

20 Una adhesina de alto peso molecular identificada en *M. catarrhalis*, ha sido denominada 200 kDa y se describe en la patente US nº 5.808.024 (Sasaki *et al.*), cedida a su cesionario así como (documento WO 96/34960) publicado el 7 de noviembre de 1996 cedida a su cesionario. La proteína de 200 kDa se ha identificado en 96 de cada 109 cepas de *M. catarrhalis*, incluyendo 73 de cada 74 cepas procedentes de la otitis media y se supone que es un factor de

25 virulencia. Existe homología de secuencia entre la proteína de 200 kDa de *M. catarrhalis* y las proteínas Hia y Hsf de *H. influenzae*. Además, el anticuerpo antinatural de 200 kDa reconoció la proteína rHia en una inmunotransferencia, lo que indica el parentesco antigénico.

No existe ningún modelo animal adecuado para la infección y enfermedad por *M. catarrhalis*, pero se ha desarrollado un análisis para el anticuerpo bactericida como análisis sustituto, tal como se describe en la patente US nº 5.808.024 mencionada anteriormente. Una proteína V56 r200 kDa truncada en el terminal N se ha expresado en *E. coli* y el anticuerpo obtenido contra V56 r200 kDa se ha demostrado que es bactericida contra las cepas homólogas y heterólogas de *M. catarrhalis*, indicando de este modo su utilidad como antígeno para vacuna. La proteína V56 r200

30 kDa procedente de la cepa 4223 de *M. catarrhalis* se utiliza en esta referencia si bien pueden utilizarse otras proteínas 200 kDa recombinantes completas y truncadas en el terminal N procedentes de otras cepas de *M. catarrhalis*. Pueden utilizarse también las proteínas naturales correspondientes.

Cuando están bajo sobrecarga ambiental, tal como temperatura elevada, los organismos sobreproducen respuesta a la sobrecarga o proteínas de choque térmico (hsp). Se ha demostrado que las hsp bacterianas son inmunógenos importantes, que estimulan tanto a los linfocitos B como a los linfocitos T (ref. 21). Las proteínas bacterianas del

35 choque térmico HtrA o DegP se expresan en condiciones de sobrecarga y la proteína HtrA o Hin47 de *H. influenzae* se ha demostrado que es un antígeno parcialmente protector en el modelo de la prueba de provocación intravesicular de la otitis media (ref. 22). Las proteínas HtrA son serina proteasas y su actividad proteolítica las hace inestables. Además, como componente de una vacuna multicomponente; la proteína HtrA natural degradará los antígenos mezclados. La mutagénesis dirigida al sitio del gen *htrA* de *H. influenzae* (denominado *hin47*) y las propiedades de los mutantes se han descrito completamente en la patente US nº 5.506.139 (Loosmore *et al.*), cedida a su cesionario.

La patente US nº 5.506.139 (Loosmore *et al.*) describe la preparación de análogos de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* que presenta una actividad de proteasa disminuida que es inferior aproximadamente al 10% de la de la

40 proteína Hin47 natural y que preferentemente presenta sustancialmente las mismas propiedades inmunológicas que la proteína Hin47 natural. La patente describe también el aislamiento, la purificación y la caracterización de moléculas de ácido nucleico que codifican los análogos de Hin47. La proteína Hin47 natural se conserva inmunológicamente entre las cepas no tipificables y encapsuladas de *H. influenzae*. La secuencia de aminoácidos de la proteína natural Hin47 y la secuencia nucleotídica del gen *hin47* codificador se describen en el documento WO 94/00149 publicado el

55 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 de la Hin47 natural que contribuye a la actividad de la proteasa o insertando por lo menos un aminoácido en la proteína Hin47 natural, tal como se describió específicamente en la presente memoria.

60 El aminoácido por lo menos eliminado o sustituido puede seleccionarse de entre los aminoácidos 195 a 201 de Hin47 y específicamente puede ser Serina-197, que puede eliminarse o sustituirse por alanina. Además, el aminoácido por lo menos eliminado o sustituido puede ser His91 y puede ser eliminado o sustituido por alanina, lisina o arginina. Además, el aminoácido por lo menos eliminado o sustituido puede ser Asp-121 y puede ser eliminado o sustituido por alanina.

65 En la patente US nº 5.869.302, cedida a su cesionario, se han descrito 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 a alanina (denominada a veces en la presente memoria "H91A") se emplea como ilustración de la proteína mutante Hin47, si bien pueden utilizarse otros mutantes de Hin47 con actividad de proteasa reducida tal como se describe en la patente y solicitud mencionadas anteriormente.

El análogo no proteolítico de HtrA, H91A Hin47, se ha demostrado que es un antígeno protector contra la bacteremia causada por *H. influenzae* de tipo b y contra la otitis media causada por *H. influenzae* no tipificable (ref. 22). HtrA se encontró en todas las cepas de *H. influenzae* examinadas, incluyendo las cepas encapsuladas. Existían también pruebas de reactividad cruzada con una proteína específica procedente de *M. catarrhalis* en la inmunotransferencia, lo que sugiere la posibilidad de un análogo de HtrA en este organismo.

El principal objetivo de una vacuna profiláctica contra la otitis media consiste en impedir la implantación de la colonización nasofaríngea incluyendo adhesinas como inmunógenos. Las proteínas HMW y Hia de *H. influenzae* son adhesinas que se ha demostrado que evitan la colonización. Sin embargo, ya que puede existir un pequeño porcentaje de cepas de *H. influenzae* que no contienen los genes *hmw* o *hia*, el antígeno H91 A Hin47 se ha añadido para proporcionar protección contra dichas cepas, aunque puede utilizarse cualquier otro análogo de Hin47 no proteolítico. La adición de una o más adhesinas de 200 kDa de *M. catarrhalis* proporciona protección frente a la colonización de este organismo. La presente invención proporciona una vacuna multicomponente para proteger contra la colonización y la enfermedad causada por organismos *H. influenzae* y *M. catarrhalis* encapsulados o no encapsulados.

Sería deseable proporcionar una combinación de vacunas eficaz que comprenda los componentes de *H. influenzae* y *M. catarrhalis* que contienen cantidades relativas seleccionadas de antígenos seleccionados.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición inmunógena multivalente para proporcionar protección en un huésped contra la enfermedad provocada por la infección con *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, que se caracteriza por lo menos por cuatro antígenos diferentes, que comprende por lo menos un antígeno procedente de *Haemophilus influenzae* y por lo menos un antígeno procedente de *Moraxella catarrhalis*, tres de cuyos antígenos por lo menos son adhesinas y uno de cuyos antígenos por lo menos procede de *Moraxella catarrhalis*.

Uno de los antígenos que es una adhesina puede ser una proteína de alto peso molecular (HMW) de una cepa no tipificable de *Haemophilus*, particularmente una proteína HMW1 o HMW2 de la cepa no tipificable, que puede ser producida de manera recombinante.

Otro de los antígenos que es una adhesina puede ser una proteína adhesina (Hia) de *Haemophilus influenzae* de una cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae* o de una proteína fibrilar de superficie (hsf) de *Haemophilus influenzae* de una cepa tipificable de *Haemophilus influenzae* que puede producirse de manera recombinante.

Un antígeno de *Haemophilus influenzae* que no es una adhesina puede ser una proteína no proteolítica de choque térmico de una cepa de *Haemophilus influenzae*, que puede ser un análogo de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* que presenta una actividad disminuida de proteasa que es inferior a aproximadamente el 10% de la de la proteína natural Hin47.

Uno de los antígenos que es una adhesina puede ser una proteína de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis* que tiene una masa molecular aparente de aproximadamente 200 kDa, determinada por SDS-PAGE, y puede producirse de manera recombinante.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, se aporta una composición inmunógena multivalente para proporcionar protección en un huésped contra la enfermedad producida tanto por *Haemophilus influenzae* como por *Moraxella catarrhalis*, que comprende: (a) un análogo de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* con actividad de proteasa disminuida que es menor que aproximadamente el 10% de la proteína natural Hin47, (b) una proteína adhesina de *Haemophilus influenzae* (Hia) de una cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae*, (c) una proteína de alto peso molecular (HMW) de una cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable, y (d) una proteína de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis* con una masa molecular aparente de aproximadamente 200 kDa, determinada por SDS-PAGE.

En dicha composición las proteínas Hin47, Hia, HMW y 200 kDa pueden estar presentes en cantidades que no proporcionen inmunogenicidades individuales de las proteínas, de modo que no exista interferencia entre los componentes con respecto a sus inmunogenicidades individuales.

El análogo de la proteína Hin47 puede ser uno en el que por lo menos un aminoácido de la proteína Hin47 natural que contribuye a la actividad de la proteasa se ha eliminado o sustituido por un aminoácido diferente y que sustancialmente tiene las mismas propiedades inmunógenas que la proteína natural Hin47.

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 natural. Pueden utilizarse mutantes específicos incluyendo serina-197 sustituido por alanina, Histidina-91 sustituido por alanina, lisina o arginina y Asp-121 sustituido por alanina.

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

Peso molecular (kDa) de la cepa de *H. influenzae* no tipificable

		12	JoyC	K21	LCDC2	PMH1	15
Proteína madura:	HMW1	125	125,9	104,4	114,0	102,4	103,5
	HMW2	120	100,9		111,7	103,9	121,9

Las proteínas Hia y 200 kDa pueden producirse de manera recombinante y pueden comprender truncamientos N-terminales, V38 rHia y V56 r200 kDa respectivamente.

La composición inmunógena de la presente invención puede formularse además con un adyuvante. Dicho adyuvante para su utilización en la presente invención puede incluir (pero no limitarse a) fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, QS21, Quil A, derivados y componentes de los mismos, matriz ISCOM, fosfato de calcio, hidróxido de calcio, hidróxido de cinc, un análogo de glucolípido, un éster de octadecilo de un aminoácido, un dipéptido de muramilo, polifosfaceno, ISCOMPREP, DC-chol, DDBA y una lipoproteína y otros adyuvantes. Las combinaciones de adyuvantes ventajosas se describen en la patente US nº 5.837.250 (documento WO 95/34308, publicado el 21 de noviembre de 1995). El adyuvante puede comprender preferentemente fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio (conocido comúnmente como alúmina).

Los componentes de la composición pueden estar presentes en cantidades apropiadas para proporcionar la respuesta inmunitaria deseada. Los componentes pueden formularse como vacuna para la administración *in vivo* al hospedador. La composición de la vacuna puede comprender:

- (a) aproximadamente del 25 a aproximadamente 100 μ g del análogo de la proteína Hin47,
- (b) aproximadamente 25 a aproximadamente 100 μ g de la proteína Hia,
- (c) aproximadamente 25 a aproximadamente 100 μ g de la proteína HMW, y
- (d) aproximadamente 25 a aproximadamente 100 μ g de la proteína de 200 kDa.

Las composiciones inmunógenas pueden formularse con otros componentes antigénicos para proporcionar una vacuna multivalente en la que el/los componente(s) antigénicos adicionales proporcionen protección contra la enfermedad producida por otro(s) patógeno(s). Dichos antígenos adicionales deberían ser tales que y estar presentes en cantidades que la inmunogenicidad de los componentes individuales de la vacuna resultante no sea proporcionada por otros componentes individuales de la composición. Dichos antígenos adicionales son preferentemente antígenos purificados en cantidades definidas para producir un componente de la vacuna.

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

La vacuna multivalente resultante puede contener también poliovirus no virulento, 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 de un toxoide tetánico o antidiftérica y un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae*, preferentemente PRP-T.

La invención se extiende a un método de inmunización de un huésped contra la enfermedad producida por la infección tanto con *Haemophilus influenzae* como con *Moraxella catarrhalis*, que incluye la otitis media, que comprende administrar al huésped una cantidad inmunoeficaz de la composición inmunógena proporcionada en la presente memoria.

Las ventajas de la presente incluyen una vacuna multivalente que puede proporcionar protección contra las enfermedades por *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* no encapsuladas de manera segura y eficaz.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 1, con los paneles A y B, presenta las respuestas inmunitarias de Hin47 anti-H91A para vacunas de la combinación H91A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en ratones. En el panel A, los componentes H91A Hin47+

ES 2 280 230 T3

rHMW + rHia estaban en una concentración de 0,3 µg cada uno y, en el panel B, estaban en una concentración de 3,0 µg cada uno. Se añadieron cantidades crecientes de r200 kDa a razón de 0, 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 µg;

la Figura 2, con los paneles A y B, presenta las respuestas inmunitarias de anti-rHMW para vacunas de la combinación H91 A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en ratones. En el panel A, los componentes H91 A Hin47+ rHMW + rHia estaban en una concentración de 0,3 µg cada uno y, en el panel B, estaban en una concentración de 3,0 µg cada uno. Se añadieron cantidades crecientes de r200 kDa a razón de 0, 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 µg;

la Figura 3, con los paneles A y B, presenta las respuestas inmunitarias de anti-rHia para vacunas de la combinación H91 A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en ratones. En el panel A, los componentes H91 A Hin47+ rHMW + rHia estaban en una concentración de 0,3 µg cada uno y, en el panel B, estaban en una concentración de 3,0 µg cada uno. Se añadieron cantidades crecientes de r200 kDa a razón de 0, 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 µg;

la Figura 4, con los paneles A, B, C y D, presenta las respuestas inmunitarias de anti-r200 kDa para vacunas de la combinación H91 A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en ratones. En el panel A, se añadieron cantidades crecientes de H91 A Hin47+ rHMW + rHia en 0, 0,3 ó 3,0 µg de cada uno a 0,3 µg de r200 kDa. En el panel B, se añadieron cantidades crecientes de H91 A Hin47+ rHMW + rHia en 0, 0,3 ó 3,0 µg de cada uno a 1,0 µg de r200 kDa. En el panel C, se añadieron cantidades crecientes de H91 A Hin47+ rHMW + rHia en 0, 0,3 ó 3,0 µg de cada uno a 3,0 µg de r200 kDa. En el panel D, se añadieron cantidades crecientes de H91 A Hin47+ rHMW + rHia en 0, 0,3 ó 3,0 µg de cada uno a 10,0 µg de r200 kDa;

la Figura 5, con los paneles A y B, presenta las respuestas inmunitarias de Hin47 anti-H91A para vacunas de la combinación H91 A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en cobayas. En el panel A, los componentes H91 A Hin47+ rHMW + rHia estaban en una concentración de 25 µg cada uno y, en el panel B, estaban en una concentración de 50 µg cada uno. Se añadieron cantidades crecientes de r200 kDa a razón de 0, 25, 50 y 100 µg;

la Figura 6, con los paneles A y B, presenta las respuestas inmunitarias anti-HMW para vacunas de la combinación H91 A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en cobayas. En el panel A, los componentes H91 A Hin47+ rHMW + rHia estaban en una concentración de 25 µg cada uno y, en el panel B, estaban en una concentración de 50 µg cada uno. Se añadieron cantidades crecientes de r200 kDa a razón de 0, 25, 50 y 100 µg;

la Figura 7, con los paneles A y B, presenta las respuestas inmunitarias anti-Hia para vacunas de la combinación H91 A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en cobayas. En el panel A, los componentes H91 A Hin47+ rHMW + rHia estaban en una concentración de 25 µg cada uno y, en el panel B, estaban en una concentración de 50 µg cada uno. Se añadieron cantidades crecientes de r200 kDa a razón de 0, 25, 50 y 100 µg;

la Figura 8, con los paneles A, B y C, presenta las respuestas inmunitarias anti-200 kDa para vacunas de la combinación H91 A Hin47+ rHMW + rHia + r200 kDa en cobayas. En el panel A, se añadieron cantidades crecientes de H91 A Hin47+ rHMW + rHia a razón de 0, 25 ó 50 µg de cada uno a 25 µg de r200 kDa. En el panel B, se añadieron cantidades crecientes de H91 A Hin47+ rHMW + rHia a razón de 0, 25 ó 50 µg de cada uno a 50 µg de r200 kDa. En el panel C, se añadieron cantidades crecientes de H91 A Hin47+ rHMW + rHia a razón de 0, 25 ó 50 µg de cada uno a 100 µg de r200 kDa;

la Figura 9 presenta la protección de la vacuna de la combinación H91A + Hin47 + rHMW + rHia + r200 kDa en el modelo de chinchilla de colonización nasofaríngea. La protección proporcionada por la vacuna de cuatro componentes se compara con la de una vacuna rHMW monocomponente, con una vacuna de dos componentes rHMW + H91 A Hin47, con una vacuna de tres componentes rHMW + H91 A Hin47 + rHia y con las referencias de convalecientes;

la Figura 10 ilustra la protección proporcionada por la vacuna de la combinación H91 A Hin47 + rHMW + rHia + r200 kDa en el modelo de chinchilla de la prueba de provocación intravesicular. La protección proporcionada por la vacuna de cuatro componentes se compara con la de una vacuna H91 A Hin47 (H91 A) monocomponente, con una vacuna de dos componentes rHMW + H91 A Hin47, con una vacuna de tres componentes rHMW + H91 A Hin47 + rHia y con las referencias de alúmina;

la Figura 11 es una ilustración esquemática del esquema de construcción para producir el plásmido DS-2150-1 que contiene el gen que codifica el análogo Hin47 de H91;

la Figura 12 es una ilustración esquemática del esquema de construcción para producir el plásmido BK-76-1-1 que contiene el grupo génico hmw1ABC de la cepa 12 de NTHi;

la Figura 13 es una ilustración esquemática del esquema de construcción para producir el plásmido BK-96-2-11 que contiene el gen que codifica Hia truncada por V38 con N truncado de la cepa 11 de NTHi; y

las Figuras 14A y 14B son una ilustración esquemática de un esquema de construcción para producir el plásmido pKS348 que contiene el gen que codifica r200 kDa de V56 truncado en N de la cepa 4223 de *M. catarrhalis*.

Descripción general de la invención

La producción y purificación de antígenos de *H. influenzae* recombinantes rHMW, rHia y H91 A Hin47 ha sido totalmente descrita en el documento WO 00/20609 mencionado anteriormente y en la patente US n° 5.506.139 mencionada anteriormente, respectivamente.

La colonización de la nasofaringe en la primera etapa en el desarrollo de la enfermedad para muchos patógenos bacterianos o víricos y vacunas que contienen moléculas de adhesina deberían proteger contra esta primera etapa en la evolución de la enfermedad. Las proteínas de alto peso molecular (HMW), encontradas en aproximadamente el 75% de *H. influenzae* no tipificable, se ha demostrado que son adhesinas que son protectoras contra la colonización cuando se administran en una composición de vacuna. Las proteínas HMW no están presentes en cepas de *H. influenzae* encapsulada o en aproximadamente el 25% de cepas de *H. influenzae* no tipificables, de este modo no son suficientes para una vacuna completamente eficaz con protección en toda la cepa.

Asimismo se ha demostrado que las proteínas Hia/Hsf son adhesinas y están presentes en todas las cepas de *H. influenzae* encapsuladas y en la mayoría de las cepas de *H. influenzae* no tipificables que no producen proteínas de HMW. La proteína rHia es protectora contra la colonización por NTHi y contra la bacteremia causada por organismos de tipo a y tipo b de *H. influenzae*. Existe un pequeño porcentaje de cepas de NTHi que no producen proteínas HMW ni Hia.

La proteína HtrA o Hin47 se encuentra en todas las cepas encapsuladas y no tipificables de *H. influenzae*. Hin47 o su mutante proteolítica H91A Hin47, protege contra la bacteremia causada por *H. influenzae* de tipo b y la otitis media causada por *H. influenzae* no tipificable, pero no evita la colonización. Hin47 es proteolítica y no puede utilizarse en formulaciones de proteínas. Una vacuna de combinación que comprende antígenos rHMW, rHia y H91 A Hin47 puede formularse para proteger contra la enfermedad por *H. influenzae*, incluyendo la otitis media.

La proteína de 200 kDa de *M. catarrhalis* está relacionada desde un punto de vista genético y antigénico con la familia Hia/Hsf de adhesinas. La inmunización con la proteína r200 kDa produce anticuerpos bactericidas interactivos. Puede formularse una vacuna de combinación que comprende los tres antígenos de *H. influenzae* y la proteína r200 kDa de *M. catarrhalis* para proteger contra la enfermedad por *H. influenzae* y *M. catarrhalis*, incluyendo la otitis media.

La composición de vacunas multicomponentes es importante. Los componentes de la vacuna deben ser compatibles y deben combinarse en proporciones apropiadas para evitar la interferencia antigénica y optimizar cualquier sinergia posible. Si se administran con otras vacunas probadas, no deben interferir en la protección proporcionada por la vacuna contra otra(s) enfermedad(es).

La preparación inmunógena y las propiedades protectoras de la vacuna de dos componentes rHMW + H91A Hin47, se describió en el documento WO 00/35477, publicado el 22 de junio de 2000.

Se compararon varias proporciones de antígeno con la vacuna de cuatro componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia + r200 kDa y se comparó la inmunogenicidad en dos especies animales. En los ratones, la adición del componente r200 kDa a la vacuna de tres componentes a baja dosis (0,3 µg de cada uno), potenció la respuesta primaria de anti-H91 A Hin47, sin embargo la respuesta de la vacuna a una dosis mayor (3,0 µg de cada uno), no fue afectada. En cobayas, la respuesta de anti-H91 A Hin47 para la vacuna de 3 ó 4 componentes fue equivalente. En ratones la respuesta anti-rHMW a la vacuna de tres componentes a baja dosis con o sin añadir antígeno r200 kDa fue muy escasa. No parecía existir un efecto sinérgico o de inhibición sobre la respuesta anti-rHMW en la adición del componente r200 kDa a la vacuna a alta dosis. No hubo ningún efecto evidente sobre la respuesta anti-rHia en la adición del componente r200 kDa a la vacuna de tres componentes a baja o alta dosis. La respuesta inmunitaria al componente r200 kDa con o sin añadir vacuna de tres componentes, fue generalmente más escasa que la observada para otros componentes. A la dosis de 1,0 µg de r200 kDa, la adición de la vacuna de tres componentes a 3 µg de cada uno, disminuyó la respuesta inmunitaria a r200 kDa. Sin embargo, a dosis más altas, la respuesta anti-r200 kDa no fue afectada por la presencia de los demás componentes. En los cobayas, la respuesta inmunitaria a cada antígeno no fue afectada por la presencia de los otros tres.

La protección proporcionada por la vacuna de cuatro componentes fue evaluada en el modelo de chinchilla de colonización nasofaríngea. Los animales fueron bien protegidos contra la colonización, a niveles equivalentes a una vacuna monocomponente de rHMW, a una vacuna de dos componentes rHMW + H91 A Hin47 o a una vacuna de tres componentes rHMW + rHia + H91 A Hin47. La protección proporcionada por la vacuna de cuatro componentes se evaluó también en el modelo de la otitis media de prueba de provocación intravesicular en chinchilla. Los animales fueron protegidos contra la otitis media, a niveles equivalentes a una vacuna monocomponente de H91 A Hin47, a una vacuna de dos componentes H91 A Hin47 + rHMW o a una vacuna de tres componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia. Estos datos demuestran que la adición de más antígenos a la vacuna no tenía un efecto perjudicial sobre la protección proporcionada por un solo componente.

En cuanto a la Fig. 1, se ilustra la respuesta inmunitaria en ratones, al antígeno H91 A Hin47 de una vacuna de tres o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 0,3 ó 3,0 µg cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 0, 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 µg. Se obtienen anticuerpos de título elevado en los sueros de la extracción final de todas las combinaciones.

En cuanto a la Fig. 2, se ilustra la respuesta inmunitaria en ratones, al antígeno rHMW de una vacuna de tres o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 0,3 ó 3,0 μg cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 0, 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 μg . La respuesta inmunitaria a la vacuna a baja dosis es muy escasa, pero se obtienen títulos altos en anticuerpos en el suero de extracción final para las vacunas de tres o cuatro componentes a alta dosis.

En cuanto a la Fig. 3, se ilustra la respuesta inmunitaria en ratones, al antígeno rHMW de una vacuna de tres o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 0,3 ó 3,0 μg cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 0, 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 μg . Se obtienen anticuerpos de título elevado en los sueros de la extracción final de todas las combinaciones.

En cuanto a la Fig. 4, se ilustra la respuesta inmunitaria en ratones, al antígeno r200 kDa de una vacuna de uno o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 0, 0,3 ó 3,0 μg cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 μg . La respuesta inmunitaria del componente r200 kDa es muy escasa a las dosis de 0,3 μg y de 1,0 μg . A las dosis mayores de 3 ó 10 μg de r200 kDa, se obtienen títulos altos en anticuerpo para los sueros de la extracción final, con independencia de la presencia o ausencia de los demás componentes.

En cuanto a la Fig. 5, se ilustra la respuesta inmunitaria en cobayas, al antígeno H91 A Hin47 de una vacuna de tres o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 25 ó 50 μg de cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 0, 25, 50 ó 100 μg . Se obtienen anticuerpos de título elevado en los sueros de la extracción final de todas las combinaciones.

En cuanto a la Fig. 6, se ilustra la respuesta inmunitaria en cobayas, al antígeno rHMW de una vacuna de tres o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 25 ó 50 μg de cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 0, 25, 50 ó 100 μg . Se obtienen anticuerpos de título elevado en los sueros de la extracción final de todas las combinaciones.

En cuanto a la Fig. 7, se ilustra la respuesta inmunitaria en cobayas, al antígeno rHia de una vacuna de tres o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 25 ó 50 μg de cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 0, 25, 50 ó 100 μg . Se obtienen anticuerpos de título elevado en los sueros de la extracción final de todas las combinaciones.

En cuanto a la Fig. 8, se ilustra la respuesta inmunitaria en cobayas, al antígeno r200 kDa de una vacuna de uno o cuatro componentes en la que los componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia se fijan a 0, 25 ó 50 μg de cada uno y se añade r200 kDa a concentraciones de 25, 50 ó 100 μg . Se obtienen anticuerpos de título elevado en los sueros de la extracción final de todas las vacunas.

En cuanto a la Fig. 9, se ilustra la protección proporcionada por la vacuna de cuatro componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia + r200 kDa contra la colonización nasofaríngea en un modelo de chinchilla. La protección es comparable a la proporcionada por una vacuna monovalente rHMW, una vacuna de dos componentes H91 A Hin47 + rHMW y una de tres componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia.

En cuanto a la Fig. 10, se ilustra la protección proporcionada por la vacuna de cuatro componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia + r200 kDa contra la colonización nasofaríngea en un modelo de chinchilla. La protección es comparable a la proporcionada por una vacuna monovalente rHMW, una vacuna de dos componentes H91 A Hin47 + rHMW y una de tres componentes H91 A Hin47 + rHMW + rHia.

Ejemplos

La exposición anterior describe de forma general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes Ejemplos específicos. Estos Ejemplos se describen únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención. Los cambios en la forma y la sustitución de equivalentes se contemplan como circunstancias que pueden sugerirse o ser convenientes. Aunque en la presente memoria se han empleado términos específicos, dichos términos se proporcionan con un sentido descriptivo y no a título limitativo.

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

Ejemplo 1

Este Ejemplo describe la preparación del componente H91 A Hin47 de la vacuna.

Se preparó el mutante de H91 A Hin47 tal como se describe en la patente US nº 5.506.139 mencionada anteriormente. En resumen, se sintetizó el oligonucleótido 5' ATCAATAACAGCATTATTGGT 3' (SEC. ID. nº 1) que cambiaría el resto de histidina en 91 por una alanina (ref. 17).

ES 2 280 230 T3

El plásmido JB-1276-1-2 es un plásmido a base de pUC que contiene el gen T7/*hin47* en un fragmento de *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 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-1277-19 (Fig. 11).

El plásmido de expresión H91 A *Hin47* (DS-1277-19) utiliza selección de ampicilina. Se clonó el gen *hin47* de T7/H91 A 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 contenía las secuencias del gen *hin47* de T7/H91 A entre las secuencias *EcoRI* y *ClaI*, con genes funcionales con resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina que contienen una repetición de las secuencias *HindIII* - *BamHI* que se encuentran tanto en pBR328 como en pEVvrf1.

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 plásmido de DS-1312-12 con *HindIII* 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/H91 A y se volvió a ligar en el propio vector de creación DS-2140-3. Se digirió el plásmido DS-2140-3 con el gen *PstI* y el *kanR* del plásmido pUC-4K (P-L Biochemicals) se insertó en la secuencia *PstI*, generando el plásmido DS-2150-1 que es *kanR* y sensible tanto a la ampicilina como a la tetraciclina.

Se preparó el ADN plásmido de DS-2150-1 procedente de un cultivo de 50 ml que utiliza un protocolo basado en el procedimiento de Holmes y Quigley (ref. 23) y que incluye 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 durante la noche en 500 ml de medio YT y se cultivaron las células a 37°C con agitación hasta que alcanzaron una $A_{620}=0,540$. El cultivo se enfrió 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 con hielo frío. La suspensión celular se centrifugó como anteriormente y el sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 250 ml de agua esterilizada enfriada con hielo. La suspensión celular se centrifugó de nuevo, y se volvieron a poner las células en 10 ml de glicerol al 10%. La suspensión en 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.

Se descongeló en hielo una alícuota de células BL21 electrocompetentes (DE3) y se le añadieron aproximadamente 9 ng de ADN de DS-2150-1. Las muestras se incubaron en hielo durante 3 min., a continuación se transfirieron a una cubeta con electrodo Gene Pulser de BioRad a -20°C y se sometieron a una pulsación eléctrica. Se añadieron 900 μ l de medio SOC y la mezcla se transfirió a un tubo de cultivo en el que se incubó a 37°C durante 1 hora antes de ser colocada en placas en agar-agar YT que contenían 25 μ g/ml de kanamicina. La placa se incubó durante la noche a 37°C y se utilizaron colonias aisladas para estudios de expresión.

Se cultivaron clones individuales 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, se recogieron a continuación y se analizaron por SDS PAGE. Se seleccionó el clon DS-2171-1-1 como clon representativo que expresa altos niveles de H91 A *Hin47*.

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

Se recogió el fluido de cultivo en botellas de transferencia estériles, se concentró y se filtró por diálisis en flujo cruzado frente a tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8,0. Las células en el concentrado se lisan utilizando un homogeneizador a alta presión (2 pasadas 15.000 psi) para liberar la proteína H91 A *Hin47*. 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 sin salida de 0,22 μ m. Los productos pueden almacenarse congelados a -70°C hasta el tratamiento ulterior.

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 por intercambio aniónico (TMAE-Fractogel) equilibrada con Tris 50 mM pH 8,0 que contiene NaCl 100 mM. La proteína H91 A *Hin47* se obtuvo en el ensayo preliminar.

Se cargó la capa acuosa en una columna de hidroxiapatito cerámico tipo 1 (CHTP-1) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM pH 8,0. La columna se lavó a continuación con tampón fosfato sódico 150 mM pH 8,0 y la H91 A *Hin47* se eluyó con tampón de fosfato sódico 175 mM, pH 8,0 que contenía NaCl 1 M.

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

La proteína H91 A *Hin47* purificada en PBS se pasó a través de un adsorbedor de 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

ES 2 280 230 T3

1 M equilibrando a continuación con PBS. El procedimiento se repitió dos veces. La proteína H91 A Hin47 filtrada por diálisis concentrada se filtró esterilizada a través de un filtro con membrana de 0,22 μm . La proteína H91 A Hin47 esterilizada se enriqueció con fosfato de aluminio. El concentrado purificado adsorbido se diluyó para producir la masa adsorbida a 400 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 2

Este Ejemplo describe la preparación del componente rHMW de la vacuna.

La producción y purificación de la proteína rHMW se ha descrito en el documento WO 00/20609, publicado el 13 de abril de 2000.

En resumen, el plásmido pHMW1-15 (ref. 13) contiene una secuencia *XbaI* en la secuencia del activador T7 y una secuencia única *BamHI* en la secuencia de codificación de la proteína HMW1A madura de la cepa 12 de *Haemophilus* no tipificable. El fragmento *XbaI-BamHI* de 1,8 kb del pHMW1-15 se eliminó y se sustituyó por un fragmento *XbaI-BamHI* de 114 bp generado a partir de oligonucleótidos. El plásmido DS-1046-1-1 de 11,3 kb resultante, por lo tanto contiene el activador T7 unido al marco con el operón *hmw1ABC* que codifica la proteína madura HMW1A de 125 kDa (Figura 12).

El plásmido DS-1046-1-1 contiene la casete del gen *T7hwm1ABC* y tiene una única secuencia *BglIII* 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 *BamHI*. Este fragmento se aisló y se ligó en la secuencia *BglIII* del plásmido DS-1046-1-1 para producir el plásmido BK-35-4 (Fig. 12). La casete con resistencia a kanamicina se escindió de pUC 4K por la restricción *SalI* y se ligó en el plásmido BK-35-4 restringido por *Sal I* para producir el plásmido BK-76-1-1 (Fig. 12).

Se preparó el ADN plásmido de BK-76-1-1 procedente de un cultivo de 50 ml que utiliza un protocolo basado en el procedimiento de Holmes y Quigley (ref. 23) y que incluye extracciones con fenol y cloroformo. El ADN plásmido se introdujo en células BL21 (DE3) de *E. coli* por electroporación utilizando un aparato de BioRad. Se cultivaron las cepas a 37°C en medio NZCYM a una densidad óptica de $A_{578} = 0,3$, a continuación se estimularon mediante adición de lactosa al 1,0% durante 4 horas. Las muestras se ajustaron a 0,2 D.O./ μl con lisis por SDS-PAGE + tampón de carga y la misma cantidad de muestra de proteína se cargó en geles SDS-PAGE. Se seleccionó el clon BK-116-1-1 como clon representativo que expresaba buenos niveles de rHMW.

La proteína HMW recombinante se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli*, y se purificó de la forma siguiente. Los sedimentos celulares de *E. coli* de 500 ml de cultivo se volvieron a poner en suspensión en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenían 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. El sedimento se continuó extrayendo 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. El sedimento se continuó extrayendo en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 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 tras 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 12 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) 4000 a una concentración final de 7%. El sedimento resultante se eliminó por centrifugación a 20.000 g durante 30 min y el sobrenadante se precipitó mediante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50% de saturación. Tras la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la solución experimentó la separación de fases yendo la proteína a la fase superior, la cual 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 en 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 permaneció soluble en estas condiciones y se añadió glicerol a la preparación rHMW1 a una concentración final del 20% para almacenaje 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 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se prepararon diferentes dosis diluyendo la solución madre con 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fosfato de aluminio en agua.

Ejemplo 3

Este Ejemplo ilustra la preparación del componente rHia de la vacuna.

En resumen, el plásmido DS-1843-2 es un plásmido a base de pBR328 en el que se ha introducido una secuencia de clonación múltiple y dos terminadores de transcripción en oligonucleótidos, entre las secuencias *EcoRI* y *PstI*, destruyendo de este modo los genes con resistencia tanto al cloranfenicol como a la ampicilina (Fig. 6B). El gen con resistencia a la kanamicina procedente del pUC-4K se insertó en la secuencia *Sal I*, para generar los plásmidos DS-

2147-1 que son resistentes a la kanamicina y sensibles a la tetraciclina. El plásmido DS-2224-1-4 es un plásmido pUC que contiene el gen sintético *cer* de *E. coli* (ref. 15) construido a partir de oligonucleótidos y flanqueado por secuencias *Bam*HI. El fragmento *Bam*HI de 290 bp del gen *cer* se insertó en la secuencia *Bam*HI de DS-2147-1 creando el plásmido BK-2-1-2. Este plásmido basado en pBR contiene por lo tanto una secuencia de clonación múltiple, el gen con resistencia a kanamicina y el gen *cer*. El plásmido BK-2-1-2 se linealizó con *Bgl* II y se desfosforiló. El plásmido DS-2186-2-1 se digirió con *Bgl*III y *Bam*HI y el fragmento T7 V38 *hla* de 3,6 kb se insertó en BK-2-1-2, creando el plásmido BK-96-2-11 (Fig. 13).

Se preparó el ADN plásmido de BK-96-2-11 procedente de un cultivo de 50 ml que utiliza un protocolo basado en el procedimiento de Holmes y Quigley (ref. 23) y que incluye extracciones con fenol y cloroformo. El ADN plásmido se introdujo en células BL21 (DE3) de *E. coli* electrocompetentes por electroporación utilizando un electroporador de BioRad. Se cultivaron las cepas a 37°C en medio NZCYM utilizando la selección de antibióticos apropiada a una densidad óptica de A_{578} de 0,3 antes de la inducción mediante adición de lactosa al 1,0% durante 4 horas. Las muestras se ajustaron a 0,2 D.O./ μ l con lisis por SDS-PAGE + tampón de carga y la misma cantidad de muestra de proteína se cargó en geles SDS-PAGE. Se seleccionó el clon BK-131-1-1 como clon representativo que expresaba buenos niveles de V38 rHia (Fig. 13).

La proteína Hia truncada recombinante se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli*, y se purificó de la forma siguiente. Los sedimentos celulares de *E. coli* de 500 ml de cultivo se volvieron a poner en suspensión en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenían 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. El sedimento se continuó extrayendo 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. El sedimento se continuó extrayendo en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 que contenía octilglucósido al 1%, se centrifugó a continuación a 20.000 g durante 30 min y se descartó el sobrenadante.

El sedimento resultante, obtenido tras las extracciones anteriores, contiene los cuerpos de inclusión. El sedimento se disolvió en 6 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía guanidina 6 M y DTT 5 mM. Se añadieron 12 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) 4000 a una concentración final de 7%. El sedimento resultante se eliminó por centrifugación a 20.000 g durante 30 min y el sobrenadante se precipitó mediante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50% de saturación. El precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se recogió 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 en 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 rHia 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 permaneció soluble en estas condiciones y se añadió glicerol a la preparación rHia a una concentración final del 20% para almacenaje a -20°C.

La concentración del componente rHia de la vacuna se ajustó a 400 μ 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 H₂O.

Ejemplo 4

Este Ejemplo ilustra la preparación del componente r200 kDa de la vacuna.

La patente US n° 5.808.024, cedida a su cesionario y el documento WO 96/34960 describen el aislamiento de un banco genómico de *M. catarrhalis* en el fago lambda, un clon 8II del fago lambda que expresa la proteína de aproximadamente 200 kDa. Se extrajo ADN y se preparó una serie de vectores de plásmido a partir de fragmentos de ADN. Se construyó el plásmido pKS348 como se muestra esquemáticamente en las Figuras 14 y 14B. El plásmido pKS47, que contiene un fragmento *Kpn*I/*Xho*I de 1,1 kb, se digirió con *Xho*I y *Kpn*I y se separó por electroforesis en gel de agarosa. Se aisló el fragmento de 1,1 kb del gel y se insertó en el plásmido pKS5 que contiene un fragmento *Xho*I/*Sal*I de 4,9 kb, que había sido digerido anteriormente con las mismas dos enzimas y se purificó para formar pKS80. Un fragmento *Pst*I de aproximadamente 5,8 kb de pKS80 se insertó en el vector pT7-7 (ref. 24) que había sido digerido con *Pst*I y se desfosforiló. La orientación de la inserción se determinó mediante análisis con enzima de restricción y se seleccionó el pKS122 para la construcción ulterior (véase la Figura 14A).

Una zona 5' de aproximadamente 500 bp del gen de 200 kDa se amplió por PCR a partir de la cepa 4223 de *M. catarrhalis* del ADN cromosómico utilizando los cebadores 5471.KS (CGCTCGCTGTCCATATGATCGGTG-CAACGCTCA - SEC. ID. n° 2) y 4257.KS (GACCCTGTGCATATGACATGGCT - SEC. ID. n° 3). El producto de PCR se digirió con *Nde*I purificado e insertado en *Nde*I digerido y pKS122 desfosforilado para proporcionar pKS348 (véase la Figura 14B). El plásmido pKS348 fue confirmado por análisis con enzima de restricción y secuenciando la pieza de ADN ampliada por PCR y sus zonas de unión. Dicho plásmido contiene ácido nucleico que codifica una proteína truncada en N de aproximadamente 200 kDa en la que el codón que codifica el aminoácido V56 está sustituido por un codón de iniciación que codifica el aminoácido M56 (proteína M56 r200 kDa).

ES 2 280 230 T3

Una colonia aislada de *E. coli*, BL21 (DE3)/pLysS, (KS358) que transportó el pKS348, se puso en suspensión en 5 ml de caldo de cultivo BHI que contenía Amp (100 μ M) y 0,4% de glucosa y se cultivó durante la noche a 37°C. Se añadieron 2,5 ml de cultivo de la noche a 250 ml de LB caldo de cultivo (Luria-Bertani) que contiene Amp (100 μ M) y Cm (50 μ M) y se cultivó en agitación a 37°C a A_{600} =0,26 a 0,44. Se provocó la expresión génica de los cultivos por adición de IPTG (concentración final: 4 mM). Las bacterias se cultivaron y se recogieron a diferentes puntos de tiempo por centrifugación. La expresión del gen de la proteína de 200 kDa en el cultivo se confirmó por análisis de SDS-PAGE utilizando tinción de azul Coomassie y por análisis de transferencia Western utilizando suero de proteína anti-200 kDa de cobaya, tal como se describe en la patente US nº 5.808.024 y en el documento WO 96/34960.

Cuando se transformó BL21 (DE3)/pLysS de *E. coli* con pKS348, los transformantes se desarrollaron bien incluso en placas de agar-agar LB y en caldo de cultivo LB que contenía antibióticos a 37°C. Después de la inducción con IPTG, estos clones produjeron una gran cantidad de proteína r200 kDa truncada en el terminal N. La proteína r200 kDa truncada en el terminal N se purificó en el cultivo de *E. coli*, tal como se muestra en la Figura 13.

Se obtuvieron sedimentos celulares de *E. coli* de cultivos preparados por centrifugación y 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 mediante tratamiento con ultrasonidos. El producto tratado con ultrasonidos se centrifugó a 20.000 $\times$ g durante 30 min. y se descartó el sobrenadante resultante. El sedimento se extrajo 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 $\times$ g durante 30 min. y se descartó el sobrenadante. Se extrajo más el sedimento en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía glucósido de octilo al 1%, a continuación se centrifugó a 20.000 $\times$ g durante 30 min. y se descartó el sobrenadante.

El sedimento resultante contenía 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 12 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a esta solución y la mezcla se centrifugó a 20.000 g durante 30 min. y se descartó el sobrenadante. El sobrenadante se precipitó añadiendo polietilenglicol (PEG) 4000 a una concentración final de 5% y se incubó a 4°C durante 30 min. El sedimento resultante se eliminó por centrifugación a 20.000 $\times$ g durante 30 min. El sobrenadante se precipitó a continuación mediante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 60% de saturación a 4°C durante la noche. 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 (considerada por la turbidez de la capa). Se recogió la fase superior, a continuación se sometió a centrifugación a 20.000 $\times$ g durante 30 min. El sedimento resultante se recogió y se disolvió en 2 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía guanidina HCl 6 M y DTT 5 mM. La solución transparente se purificó en una columna de filtración en 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 r200 kDa purificada se agruparon. La fracción agrupada se concentró 5 a 10 veces utilizando una centriprep 30 y a continuación se dializaron durante la noche a 4°C frente a PBS, y se centrifugaron a 20.000 $\times$ g durante 30 min para clarificar.

La proteína permaneció soluble en estas condiciones y se añadió glicerol a la preparación M56 r200 kDa a una concentración final del 20% para almacenaje a -20°C. El rendimiento medio de la proteína purificada M56 r200 kDa es aproximadamente de 10 mg l⁻¹ de cultivo.

La concentración del componente r200 kDa de la vacuna se ajustó a 400 μ 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 H₂O.

Ejemplo 5

Este Ejemplo describe la combinación de H91 A Hin47 + rHMW + rHia + r200 kDa como una vacuna de cuatro componentes.

En resumen, se prepararon vacunas que comprendían la combinación de rHia con una vacuna de dos componentes H91 A Hin47 y rHMW, preparada tal como se describe en el documento WO 00/35477 publicado el 22 de junio de 2000. Se combinaron los componentes 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.

Se prepararon vacunas que comprendían las siguientes combinaciones de r200 kDa con la vacuna de tres componentes como en la Tabla II:

ES 2 280 230 T3

TABLA II

μg de r200 kDa $\rightarrow$ μg de 3 componentes↓	0	0,3	1,0	3,0	10,0	25	50	100
0		m	m	m	m	gp	gp	gp
0,3 + 0,3 + 0,3	m	m	m	m	m			
3,0 + 3,0 + 3,0	m	m	m	m	m			
25 + 25 + 25	gp					gp	gp	gp
50 + 50 + 50	gp					gp	gp	gp

Notas: 3 componentes se refiere a H91 A Hin47 + rHMW + rHia
m indica que la vacuna se utilizó para inmunizar ratones.
gp indica que la vacuna se utilizó para inmunizar cobayas.

Los componentes de la vacuna en la Tabla II se combinaron el día 0, se mezclaron durante la noche a 4°C y se tomaron alícuotas el día 1. Todas las vacunas se almacenaron a 4°C durante todo el periodo de inmunización.

Ejemplo 6

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

La inmunogenicidad de una vacuna de tres componentes compuesta por H91A Hin47 + rHMW + rHia se ha descrito en la solicitud de patente US n° 09/261.182 pendiente de trámite mencionada anteriormente.

Grupos de cinco ratones BALB/c (Charles River, Quebec) se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) los días 1, 29 y 43 con una de las vacunas para ratones descrita en el Ejemplo 5. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 14, 28, 42 y 56.

Grupos de cinco cobayas Hartley no consanguíneos (Charles River, Quebec) se inmunizaron por vía intramuscular (i.m.) los días 1, 29 y 43 con una de las vacunas para cobayas descritas en el Ejemplo 5. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 14, 28, 42 y 56.

Se determinaron los títulos de los anticuerpos anti-H91 A Hin47, anti-rHMW, anti-rHia y anti-r200 kDa IgG por ensayos de inmunosorbente ligado a la enzima específica para el antígeno (ELISA). Pocillos de microvaloración (NuncMAXISORB, Nunc, Dinamarca) se recubrieron con 100 μl de solución de proteína (0,2 μg ml^{-1}). Los anticuerpos secundarios utilizados eran fragmentos F(ab')₂ purificados por afinidad de IgG antirratón de cabra (específico para Fc) o anticuerpos IgG anti-cobaya (específico para Fc) conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Labs, Mississauga, Ontario). Se desarrollaron las reacciones 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 MCC de Flor Multiskan (ICN Biomedicals, Mississauga, Ontario). El título reactivo de un antisuero se definió como el recíproco de la dilución que muestra constantemente un aumento al doble de la absorbancia sobre el obtenido con la muestra de suero extraída previamente.

Los resultados de los estudios de inmunogenicidad se ilustran en las Figuras 1 a 8. Como se muestra en la Figura 1, paneles A y B, el suero de la extracción final obtenido de ratones inmunizados con 0,3 μg o 3,0 μg de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia con 0, 0,3, 1,0, 3,0 ó 10,0 μg de r200 kDa añadido, todos tenían títulos altos de anticuerpo para el componente H91 A Hin47. Con la dosis baja la vacuna de tres componentes, puede existir un efecto sinérgico en la respuesta primaria anti-H91 A Hin47 con r200 kDa añadido.

Como se muestra en la Figura 2, paneles A y B, el suero de extracción final obtenido de ratones inmunizados con 3 μg de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia con 0, 0,3, 1,0, 3,0 ó 10,0 μg de r200 kDa añadido, todos tenían anticuerpos con valor alto para el componente rHMW. La vacuna a baja dosis fue poco inmunógena. No hubo mejora o efecto de inhibición aparentes en la respuesta a anti-rHMW con la adición del componente r200 kDa.

Como se muestra en la Figura 3, paneles A y B, el suero de extracción final obtenido de ratones inmunizados con 3 μg de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia con 0, 0,3, 1,0, 3,0 ó 10,0 μg de r200 kDa añadido, todos tenían anticuerpos con valor alto contra el componente rHia. No hubo mejora o efecto de inhibición aparentes en la respuesta a anti-rHia con la adición del componente r200 kDa.

Como se muestra en la Figura 4, paneles A a D, el suero de extracción final obtenido de ratones inmunizados con 10 μg de r200 kDa añadido a 0, 0,3, ó 3,0 μg de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia, todos tenían anticuerpos con título alto contra el componente r200 kDa. No hubo mejora o efecto de inhibición aparentes en la respuesta a anti-r200 kDa con la adición de los demás componentes de la vacuna. Sin embargo, a dosis menores de r200 kDa, la vacuna fue poco inmunógena y a la dosis de 1,0 μg , existe un efecto inhibidor de los componentes añadidos a la respuesta a anti-r200 kDa.

ES 2 280 230 T3

Los datos en ratones demuestran que la naturaleza preferida de la composición de una vacuna multicomponente impidiendo la supresión a las respuestas a antígenos individuales.

La inmunogenicidad en cobayas se ilustra en las Figuras 5 a 8. Como se muestra en la Figura 5, paneles A y B, el suero de extracción final obtenido de cobayas inmunizados con 25 μg o 50 μg de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia con 0, 25, 50 ó 100 μg de r200 kDa añadido, tenían en su totalidad anticuerpos con título alto contra el componente H91 A Hin47. No hubo mejora o efecto de inhibición aparentes en la respuesta a anti-H91 A Hin47 con la adición del antígeno r200 kDa.

Como se muestra en la Figura 6, paneles A y B, el suero de extracción final obtenido de cobayas inmunizados con 25 μg o 50 μg de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia con 0, 25, 50 ó 100 μg de r200 kDa añadido, tenían en su totalidad anticuerpos con título alto contra el componente rHMW. No hubo mejora o efecto de inhibición aparentes en la respuesta a anti-rHMW con la adición del antígeno r200 kDa.

Como se muestra en la Figura 7, paneles A y B, el suero de extracción final obtenido de cobayas inmunizados con 25 μg o 50 μg de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia con 0, 25, 50 ó 100 μg de r200 kDa añadido, tenían en su totalidad anticuerpos con título alto contra el componente rHia. No hubo mejora o efecto de inhibición aparentes en la respuesta a anti-rHia con la adición del antígeno r200 kDa.

Como se muestra en la Figura 8, paneles A, B y C el suero de extracción final obtenido de cobayas inmunizados con 25, 50 ó 100 μg de r200 kDa con 0, 25 ó 50 μg añadido de cada H91 A Hin47 + rHMW + rHia, tenían en su totalidad anticuerpos con título alto contra el componente r200 kDa. No hubo efecto estadísticamente significativo sobre los títulos del anticuerpo anti-r200 kDa para alguna de las extracciones intermedias, al aumentar las cantidades de los demás componentes añadidos. Sin embargo, no hubo ningún efecto significativo sobre las extracciones finales.

Ejemplo 7

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

En chinchillas jóvenes, se ha demostrado que la colonización nasofaríngea con *H. influenzae* no tipificable conduce a la otitis media (ref. 17). rHMW es parcialmente protectora en un modelo de prueba de provocación de colonización nasofaríngea, tal como se describe en la solicitud de patente US 09/167.568 mencionada anteriormente. En este modelo, se inmunizan i.m. los animales los días 0, 14 y 28 con 25, 50 ó 100 μg de rHMW adsorbida en alúmina, y se someten a prueba de provocación el día 44 con 10^8 cfu de bacterias vivas administradas por vía intranasal (50 μl por nariz). El lavado nasofaríngeo se realiza 4 días después de la prueba de provocación utilizando 1 ml de solución salina como lavado. Se colocan en placas 25 μl de lavado en agar-agar con chocolate en presencia de estreptomycin y se incuban las placas a 37°C durante 24 h. (La cepa de la prueba de provocación se hizo resistente a la estreptomycin por pasadas en serie, para facilitar la cuantificación de las bacterias recuperadas en presencia de la flora natural que es destruida por la estreptomycin). Se utilizan como referencias animales convalecientes o los pseudoinmunizados con sólo alúminas. Para el estudio de la vacuna multicomponente, se mezclaron 50 μg de cada H91 A Hin47, rHMW, rHia y r200 kDa tal como se describe en el Ejemplo 5 y se inmunizaron las chinchillas tal como se describió anteriormente. Los resultados del estudio de protección se presentan en la Figura 9 que indica que existe todavía excelente protección proporcionada en el modelo de la prueba de provocación de colonización nasofaríngea por la combinación de rHMW + rHia + H91 A Hin47 + r200 kDa.

H91 A Hin47 es parcialmente protectora en el modelo de chinchilla de la otitis media, tal como se describió en la patente US nº 5.506.139 mencionada anteriormente. En este modelo, chinchillas de 1 a 2 años (Moulton Chinchilla Ranch, Rochester, Minnesota) se inmunizan i.m. los días 0, 14 y 28 con 30 μg de H91 A Hin47 adsorbida en alúmina, y se sometieron a la prueba de provocación el día 44 con 50 a 350 cfu de organismos vivos administrados en el espacio del oído medio por la vesícula epitimpanica (ref. 14). Los animales se controlan por timpanometría y se recoge 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. Se utilizan como referencias animales convalecientes o los pseudoinmunizados con alúmina solo. Para el estudio de la vacuna multicomponente, se combinaron 50 μg de cada H91 A Hin47, rHMW, rHia y r200 kDa tal como se describe en el Ejemplo 5 y se inmunizaron las chinchillas tal como se describió anteriormente. Los resultados del estudio de protección se presentan en la Figura 10 que indica que existe todavía protección parcial proporcionada en el modelo de la prueba de provocación intravesicular por la combinación de rHMW + rHia + H91 A Hin47 + r200 kDa.

Ejemplo 8

Este Ejemplo ilustra las propiedades bactericidas de la composición.

No existe ningún modelo animal aplicable para la infección por *Moraxella catarrhalis* pero se ha desarrollado un ensayo bactericida de anticuerpos como un ensayo sustituto. En resumen, se cultivó la cepa 4223 de *M. catarrhalis* durante la noche en caldo de cultivo de infusión térmica de cerebro (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, MI) a 37°C. El cultivo de la noche se subcultivó en 10 ml de caldo de cultivo BHI y se desarrolló a $A_{528}=0,5$.

ES 2 280 230 T3

Se diluyeron las bacterias (10^{-3} ó 10^{-4}) en solución salina tamponada Veronal (VBS, pH 7,6) que contenía NaCl 140 mM, NaHCO_3 93 mM, barbiturato sódico 2 mM, ácido barbitúrico 4 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mM y albúmina de suero bovino al 0,1%. Se calentaron suero anti-r200 kD de cobaya y suero de referencia preinmunitario a 56°C durante 30 min. para inactivar el complemento endógeno. El suero y el antisuero se diluyeron en VBS y se colocaron en hielo.

Se añadieron 25 μl de suero preinmune diluido o antisuero de ensayo a los pocillos de una placa de microvaloración Nunc de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Se añadieron 25 μl de células bacterianas diluidas a cada uno de los pocillos. Se diluyó 1:10 en VBS un complemento para cobayas (BioWhittaker, Walkerville, MD), y se añadieron porciones de 25 μl a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 60 min., agitando suavemente a 70 rpm en una plataforma rotatoria. Se colocaron en placas de agar-agar Mueller Hinton (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD) 50 μl de cada mezcla de reacción. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y a continuación se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas más. Se hizo el recuento del número de colonias por placa y se estimaron los valores promediados de las colonias por placa en pares por duplicado.

Cuando se comparan las placas de suero preinmune con las placas de referencia de PBS (sin suero), el suero preinmune no presentaba ningún efecto bactericida sobre la cepa homóloga 4223. Por consiguiente, se supone que el número de colonias por placa en las placas de suero preinmune representaba el 100% de viabilidad para cada cepa y se calculó el porcentaje de destrucción bactericida de la manera siguiente:

$$100\% - \frac{[\text{número promedio de colonias por placa en grupo de antisuero anti r200 kD} \times 100\%]}{\text{número promedio de colonias por placa en grupo de suero preinmune}}$$

Utilizando este análisis, se compararon la actividad relativa del anticuerpo bactericida de los antisueros anti-r200 kDa y anti-4 componentes (H91 A Hin47 + rHMW + rHia + r200 kDa) y se descubrió que eran equivalentes. Estos datos, publicados en las Tablas III y IV a continuación, indican que no existe ningún efecto desfavorable sobre la actividad bactericida del anticuerpo anti-r200 kDa cuando están presentes anticuerpos contra antígenos adicionales.

Sumario de la exposición

En el sumario de esta exposición, la presente invención proporciona una vacuna multivalente contra la enfermedad producida tanto por *Haemophilus influenzae* como por *Moraxella catarrhalis*, incluyendo la otitis media, que presenta un amplio espectro de eficacia y que comprende tres antígenos diferentes de *Haemophilus influenzae*, dos de cuyos antígenos diferentes son una adhesina y un antígeno de *Moraxella catarrhalis*, que está relacionado antigénicamente con uno de los antígenos de *Haemophilus influenzae*. Es posible introducir modificaciones dentro del alcance de la presente invención.

TABLA III

Destrucción en porcentaje de 4223 por GP 1409-13 a r200 kD (alúmina) y GP 1449-53 rH91, α Hia, HMW, r200 kD (alúmina)

	DILUCIÓN DE ANTISUERO						
	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
GP 1409-13 α r200 kD (alúmina)	83%	57%	32%	25%	20%		
GP 1449-53 α rHia, rHMW, r200 kD, rH91 A (alúmina)	71%	47%	15%	17%	5%		
GP 1338-43 α r200 kD			100%	99%	99%	96%	78%

LM613, 11.12.98

Referido a $\log_{10} = -4$ dilución de 4223

El recuento medio de colonias de la extracción previa fue 482

ES 2 280 230 T3

TABLA IV

Destrucción en porcentaje de 4223 por combinación de antisueros

Dilución de antisuero:	Bact. Dil = log ₁₀ -4				Bact. Dil = log ₁₀ -3			
	1/64	1/256	1/1024	1/4096	1/64	1/256	1/1024	1/409
GP 1631-36 α rHia rH91 A, rHMW, r200 kD (FCA/FIA)	72%	41%	49%	43%	12%	0%	30%	9%
GP 1637 -40 α r200 kD (FCA/FIA)	90%	76%	59%	38%	88%	715	26%	3%
GP 1651-55 α rHia rH91 A, rHMW, r200 kD (alúmina)	79%	37%	66%	43%	65%	0%	5%	0%
GP 1656-60 α r200 kD (alúmina)	86%	79%	74%	54%	77%	25%	22%	4%
GP 1338-43 α r200 kD (referencia)	975	95%	84%	59%	92%	89%	77%	47%

LM615, 16.12.98

El recuento promedio de colonias extraídas previamente a dilución log₁₀-4 de 4223 fue 720

El recuento promedio de colonias extraídas previamente a dilución log₁₀-3 fue 58

Referencias

1. **Barbour, M.L., R.T. Mayon-White, C. Cole, D.W.M. Crook, y 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 conjugate, *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, y 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, y 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. **Ioannidis, J.P.A., M. Worthington, J.K. Griffiths, y D.R. Snyderman.** 1995 Spectrum and significance of bacteremia due to *Moraxella catarrhalis*. *Clin. Infect. Dis.* 21:390-397.

10. **Meyer, G.A., t.R. Shope, N.J. Waeker, Jr., y F.H. Lanningham.** 1995 *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* bacteremia in children. *Clin. Pediatr.* 34:146-150.

11. **Enright, M.C. y M.H. McKenzie.** 1997. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*- clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *J. Med. Microbiol.* 46:360-371.

12. **Barenkamp, S.J., y F.F. Bodor.** 1990. Development of serum bactericidal activity following non-typable *Haemophilus influenzae* acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis.* 9:333-339.

13. **Barenkamp, S.J.**, y **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.

14. **St. Geme III J.W.**, **V.V. Kumar**, **D. Cutter**, y **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

15. **St. Geme III, J.W.**, **S. Falkow**, y **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.

16. **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.

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

18. **St. Geme, J.W.** y **D. Cutter.** 1995. Evidence that surface fibrils expressed by *Haemophilus influenzae* type b promote attachment to human epithelial cells. *Molec. Microbiol.* 15:77-85.

19. **Barenkamp, S.J.** y **J.W. St. Geme.** 1996. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Molec. Microbiol.* 19:1215-1223.

20. **St. Geme, J.W.**, **D. Cutter** y **S.J. Barenkamp.** 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type be surface fibril. *J. Bact.* 178:6281-6287.

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

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

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

24. **Tabor S.** y **Richardson C.C.**, 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82(4): 1074-1078.

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunógena multivalente para proporcionar protección en un huésped contra la enfermedad provocada tanto por *Haemophilus influenzae* como por *Moraxella catarrhalis*, **caracterizada** por:

por lo menos por cuatro antígenos diferentes que comprenden por lo menos un antígeno procedente de *Haemophilus influenzae* y por lo menos un antígeno procedente de *Moraxella catarrhalis*, siendo por lo menos tres de dichos antígenos adhesinas y por lo menos uno de dichos antígenos procede de *Moraxella catarrhalis*.

2. Composición inmunógena según la reivindicación 1, en la que uno de dichos antígenos que es una adhesina es una proteína de alto peso molecular (HMW) de una cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae*, preferentemente una proteína HMW1 o HMW2 de la cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae*, preferentemente producida de manera recombinante.

3. Composición inmunógena según la reivindicación 2, en la que dichas proteínas HMW1 y HMW2 derivan de la cepa respectiva de *Haemophilus influenzae* no tipificable y poseen los pesos moleculares respectivos indicados en la Tabla siguiente:

Peso molecular (kDa) de la cepa de *H. influenzae* no tipificable

		12	JoyC	K21	LCDC2	PMH1	15
Proteína madura:	HMW1	125	125,9	104,4	114,0	102,4	103,5
	HMW2	120	100,9		111,7	103,9	121,9

4. Composición inmunógena según la reivindicación 1 ó 2, en la que otro de los antígenos que es una adhesina es una proteína adhesina de *Haemophilus influenzae* (Hia) de una cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae* o de una proteína fibrilar de superficie de *Haemophilus influenzae* (Hsf) de una cepa tipificable de *Haemophilus influenzae*, producida preferentemente de manera recombinante.

5. Composición inmunógena según la reivindicación 4, en la que dicha proteína Hia producida de manera recombinante es una V38 rHia con truncamiento en el terminal N.

6. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que un antígeno de *Haemophilus influenzae* que no es una adhesina es una proteína no proteolítica de choque térmico de una cepa de *Haemophilus influenzae*, preferentemente un análogo de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* que presenta una actividad disminuida de proteasa que es inferior al 10% de la que presenta la proteína natural Hin47.

7. Composición inmunógena según la reivindicación 6, en la que dicho análogo de la proteína Hin47 es uno en el que por lo menos un aminoácido de la proteína Hin47 natural que contribuye a la actividad de la proteasa se ha eliminado o sustituido por un aminoácido diferente y que presenta sustancialmente las mismas propiedades inmunógenas que la proteína natural Hin47.

8. Composición inmunógena según la reivindicación 7, en la que dicho por lo menos un aminoácido se selecciona de entre el grupo constituido por los aminoácidos 91, 121 y 195 a 207 de la proteína Hin47 natural, preferentemente la serina-197 se sustituye por alanina, la histidina-91 se sustituye por alanina, lisina o arginina y Asp-121 se sustituye por alanina.

9. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que uno de dichos antígenos que es una adhesina es una proteína de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis* que presenta una masa molecular aparente de 200 kDa, como se ha determinado por SDS-PAGE, producida preferentemente de manera recombinante.

10. Composición inmunógena según la reivindicación 9, en la que la proteína de 200 kDa producida de manera recombinante es una V56 r200 kDa con truncamiento en el terminal N.

11. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:

- (a) un análogo de la proteína Hin47 de *Haemophilus influenzae* con actividad de proteasa disminuida que es inferior al 10% que la de la proteína Hin47 natural,
- (b) una proteína adhesina de *Haemophilus influenzae* (Hia) de una cepa no tipificable de *Haemophilus influenzae*,
- (c) una proteína de alto peso molecular (HMW) de una cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable, y

- (d) una proteína de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis* con una masa molecular aparente de 200 kDa, como se ha determinado por SDS-PAGE.

12. Composición inmunógena según la reivindicación 11, en la que dichas proteínas Hin47, Hia, HMW y 200 kDa están presentes en cantidades que no proporcionan las inmunogenicidades individuales de las proteínas.

13. Composición inmunógena según la reivindicación 11 ó 12, que comprende:

(a) 25 a 100 μ g del análogo de la proteína Hin47, y

(b) 25 a 100 μ g de la proteína Hia,

(c) 25 a 100 μ g de la proteína HMW, y

(d) 25 a 100 μ g de la proteína de 200 kDa.

14. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además un adyuvante, preferentemente hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

15. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además por lo menos un componente antigénico adicional para proporcionar protección contra la infección provocada por otro patógeno, preferentemente seleccionado de entre el grupo constituido por toxoide diftérico, toxoide tetánico y antígenos de tos ferina, poliovirus no virulento y PRP-T, seleccionándose más preferentemente dichos antígenos de tos ferina de entre el grupo constituido por toxoide de tos ferina, hemaglutinina filamentosa, pertactina y aglutinógenos.

16. Composición inmunógena multivalente que comprende por lo menos cuatro antígenos diferentes, que comprende por lo menos un antígeno procedente de *Haemophilus influenzae* y por lo menos un antígeno procedente de *Moraxella catarrhalis*, siendo por lo menos tres de dichos antígenos adhesinas y por lo menos una de las adhesinas procede de *Moraxella catarrhalis* para su utilización en proporcionar protección en un huésped contra la enfermedad provocada por *Haemophilus influenzae* como por *Moraxella catarrhalis*.

17. Composición inmunógena según la reivindicación 16, en la que dichos por lo menos cuatro antígenos diferentes son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15.

18. Utilización de por lo menos cuatro antígenos diferentes, que comprende por lo menos un antígeno procedente de *Haemophilus influenzae* y por lo menos un antígeno procedente de *Moraxella catarrhalis*, siendo por lo menos tres de dichos antígenos una adhesina y por lo menos una de dichas adhesinas procede de *Moraxella catarrhalis* en la preparación de una composición inmunógena multivalente destinada a proporcionar protección en un huésped contra la enfermedad provocada tanto por *Haemophilus influenzae* como por *Moraxella catarrhalis*.

19. Utilización según la reivindicación 18, en la que dichos por lo menos cuatro antígenos diferentes son como se define en las reivindicaciones 2 a 15.

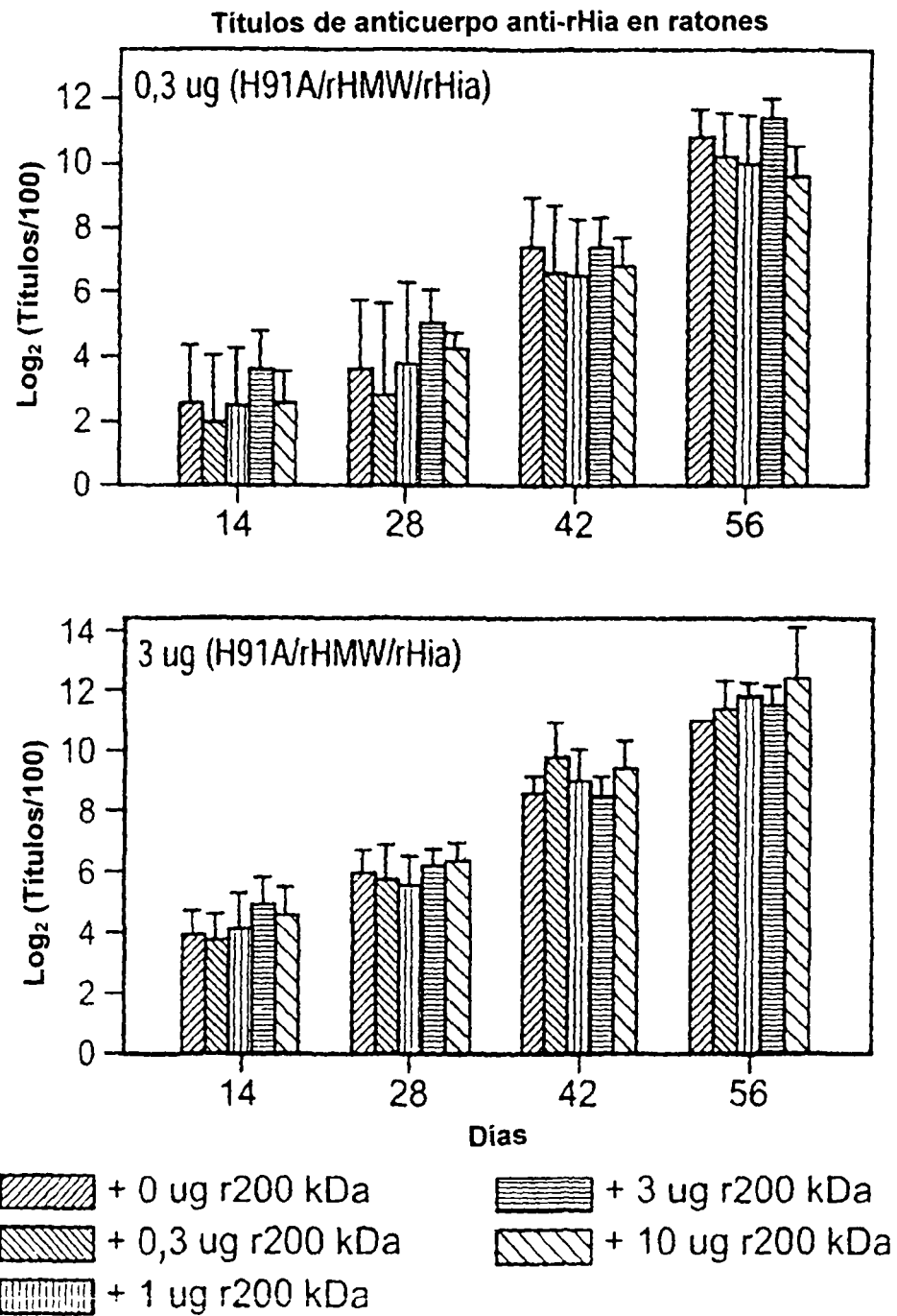


FIG.1

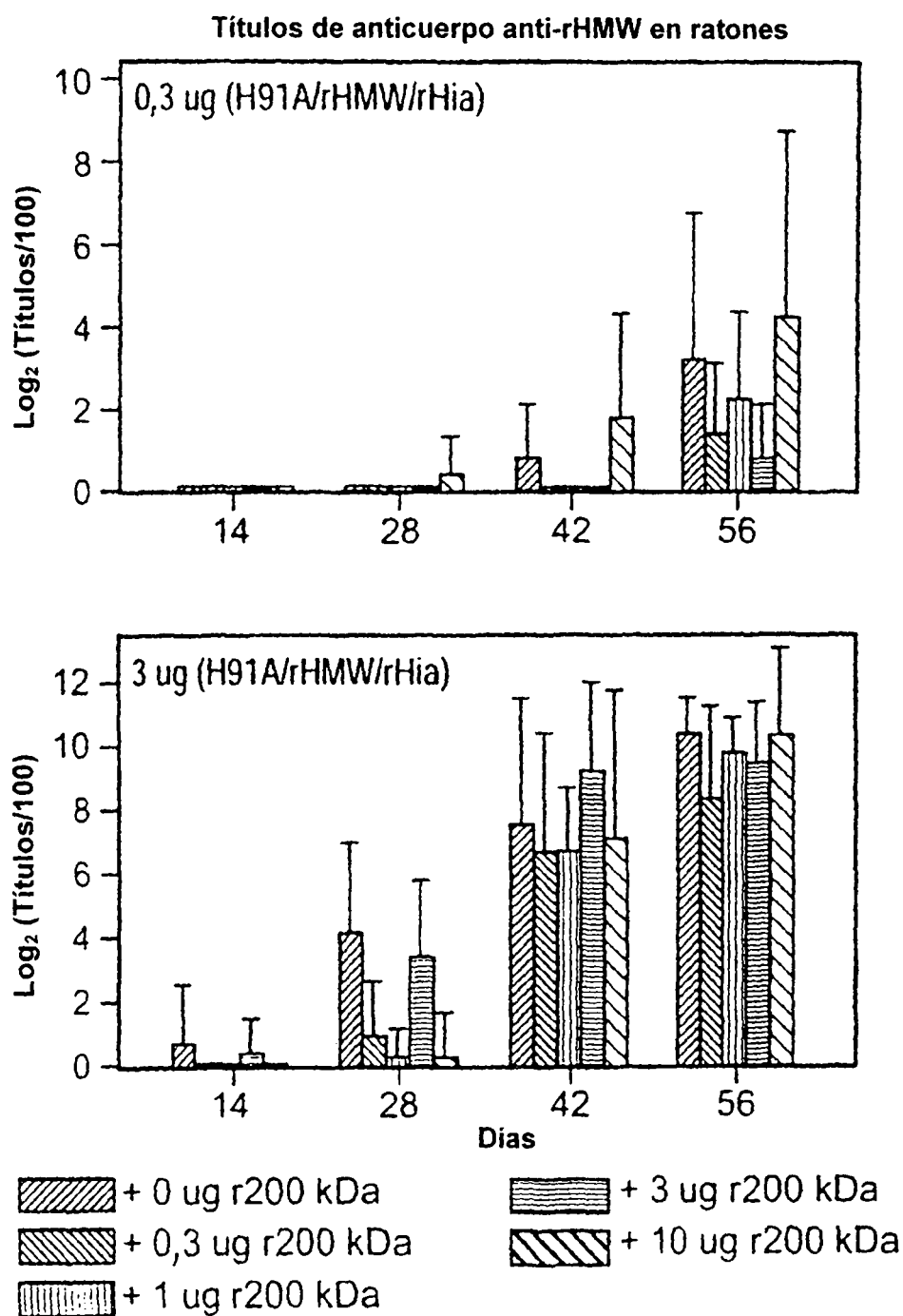


FIG.2

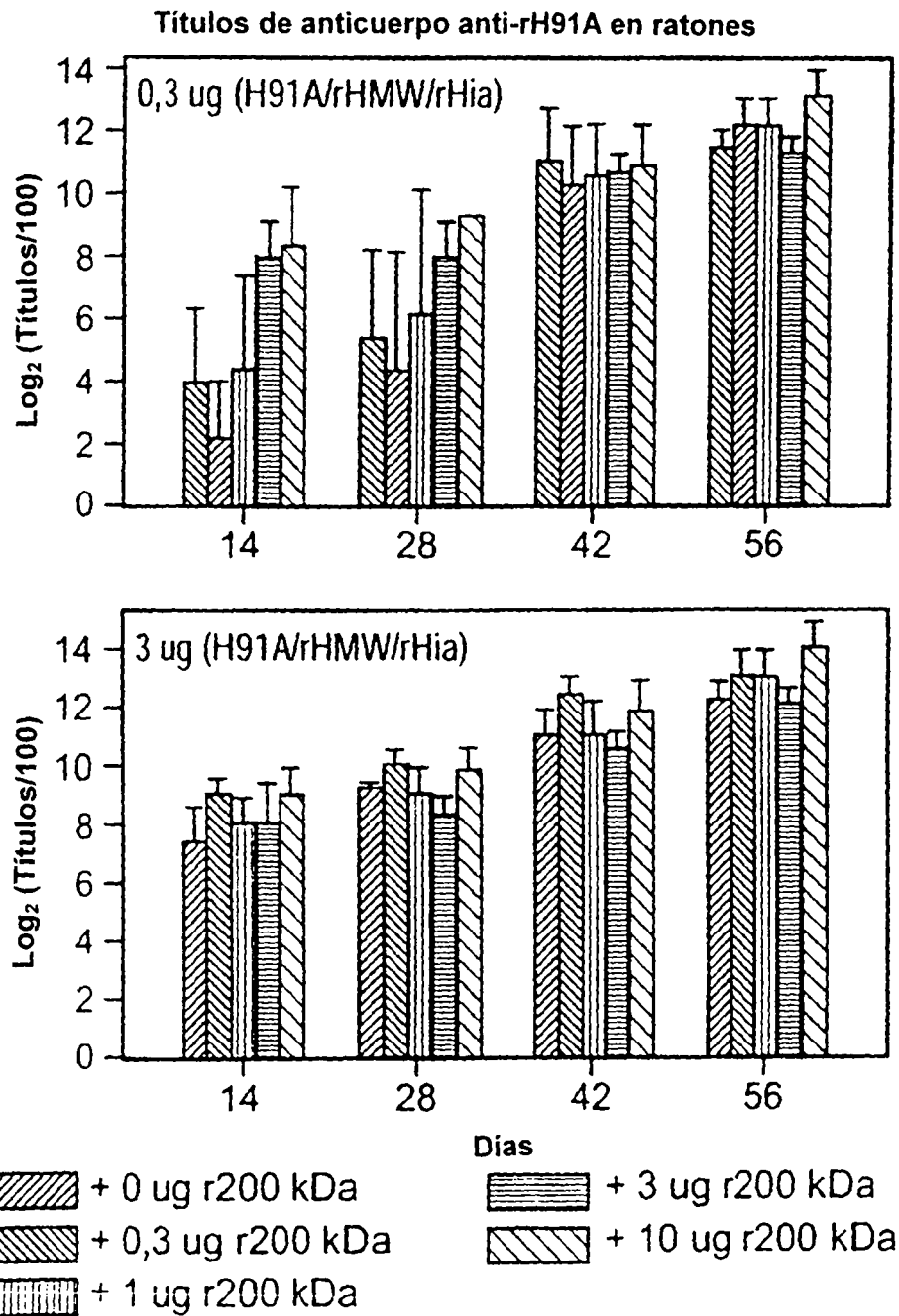


FIG.3

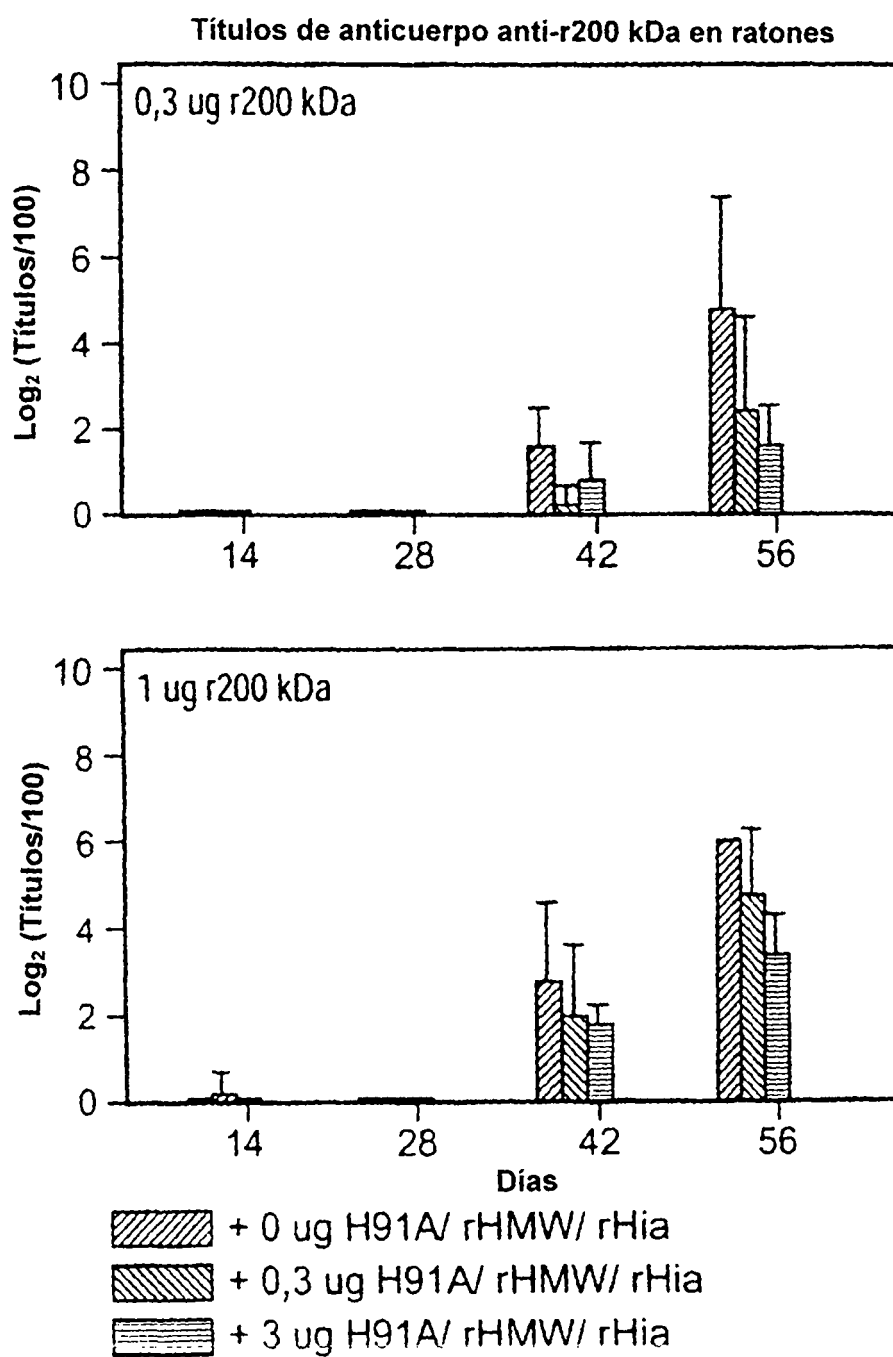


FIG.4

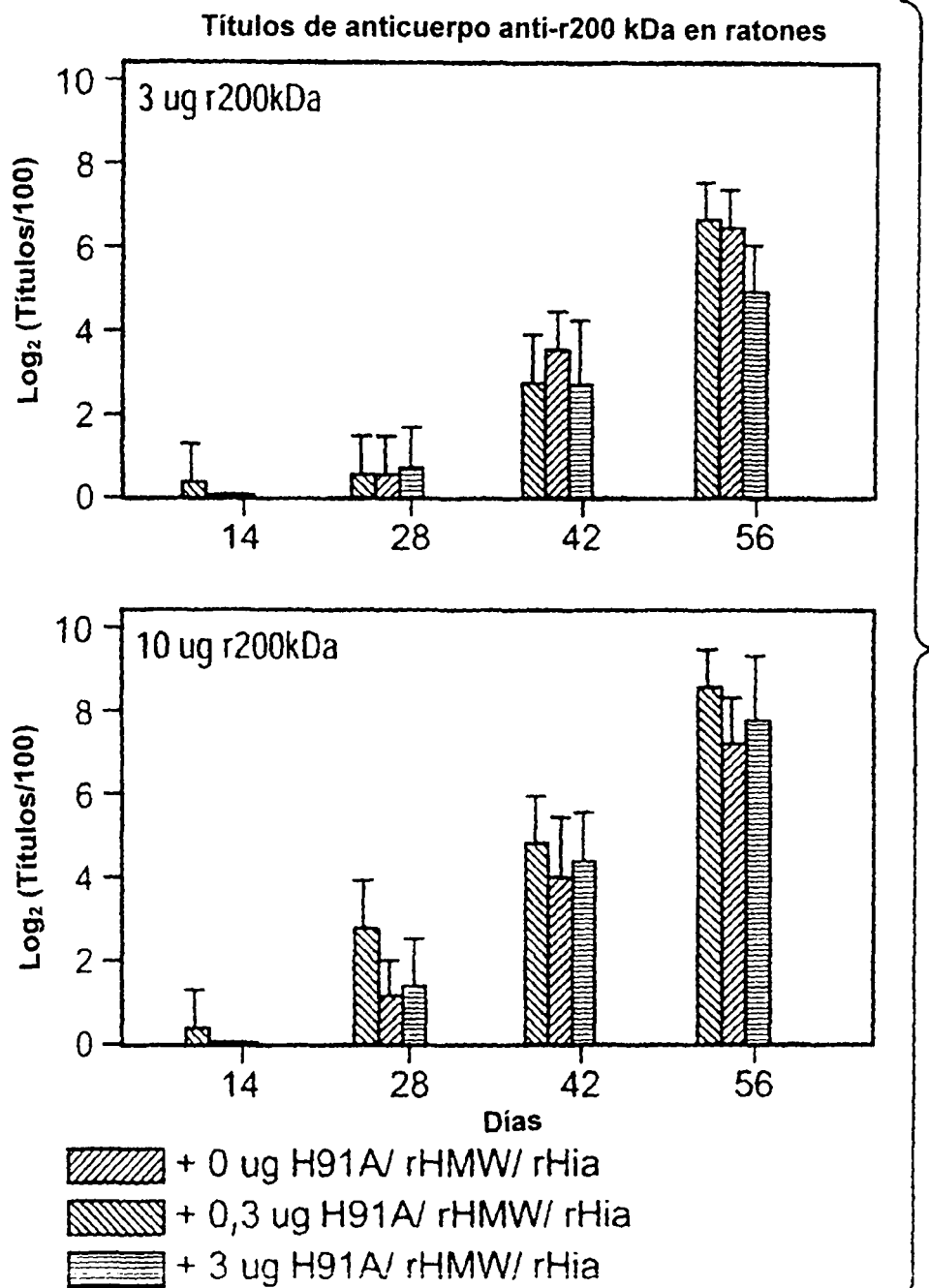


FIG.4B

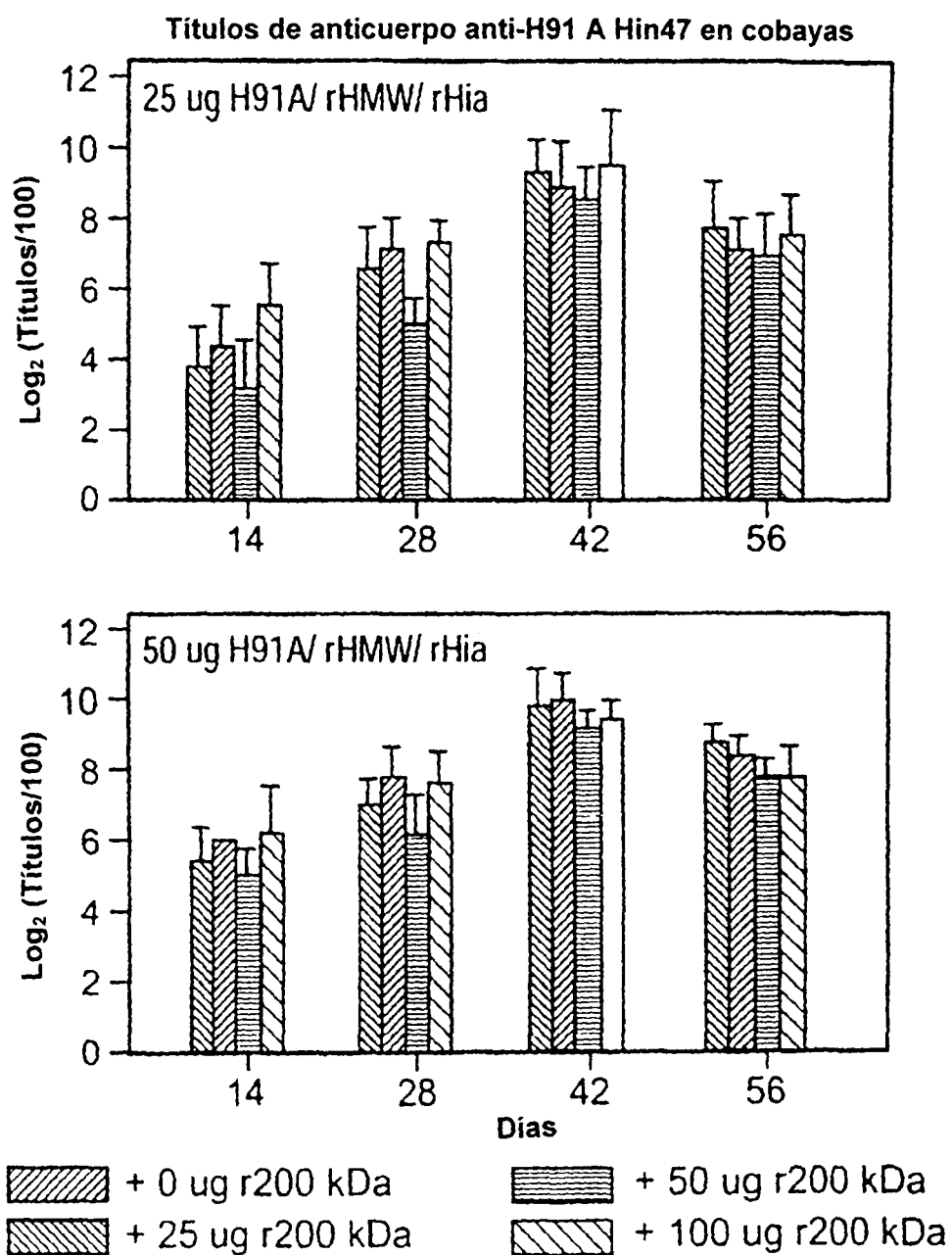


FIG.5

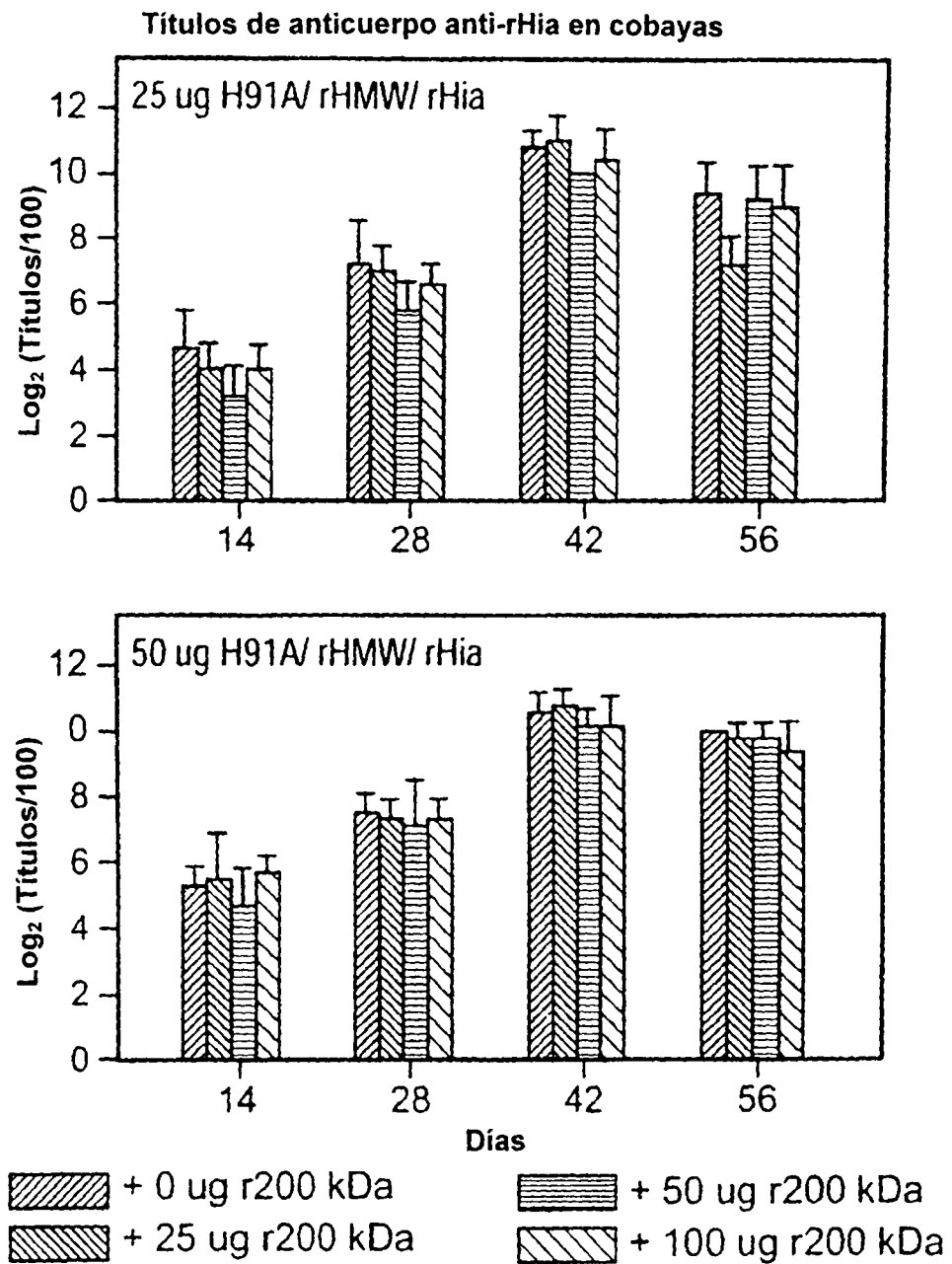


FIG.6

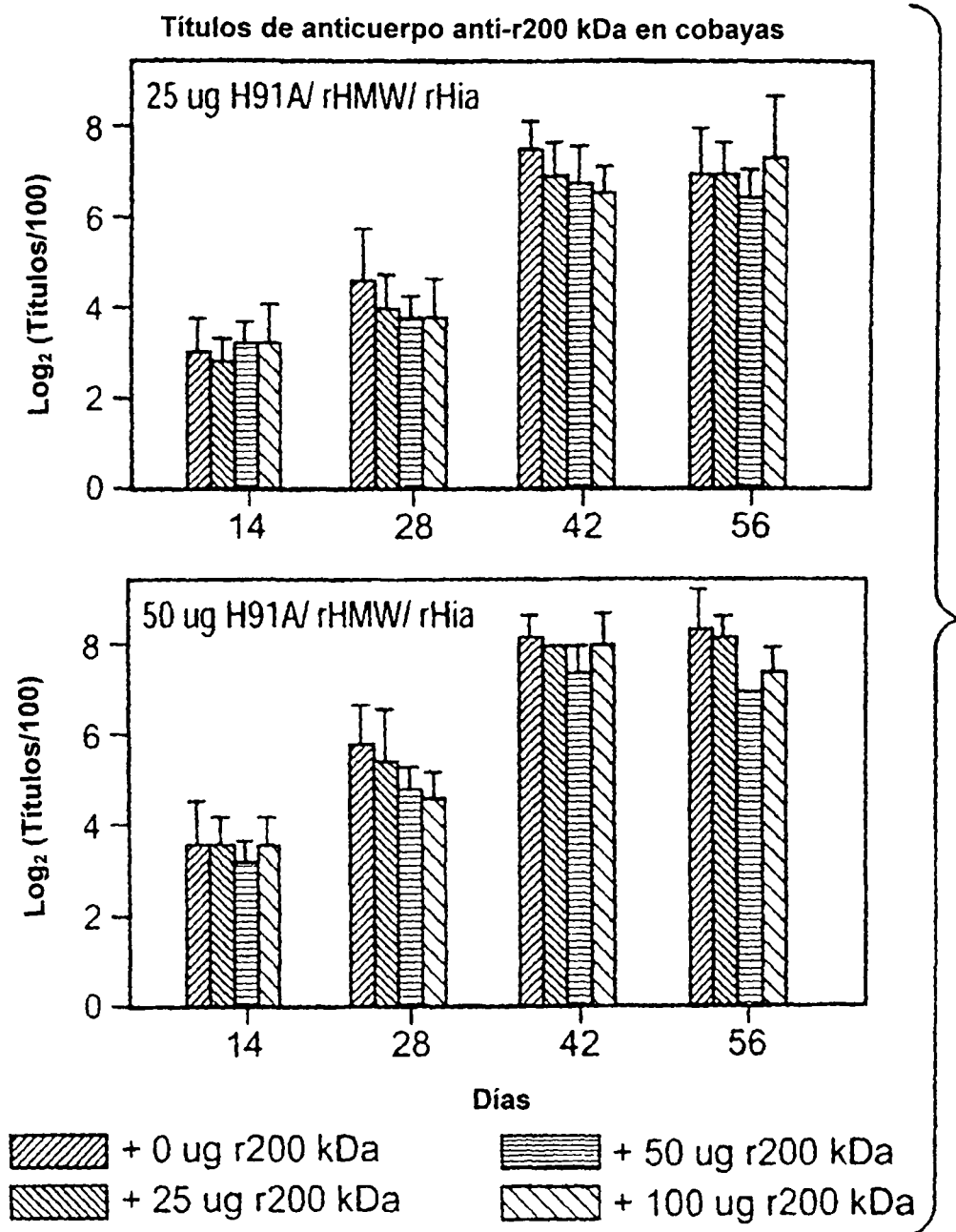


FIG.7

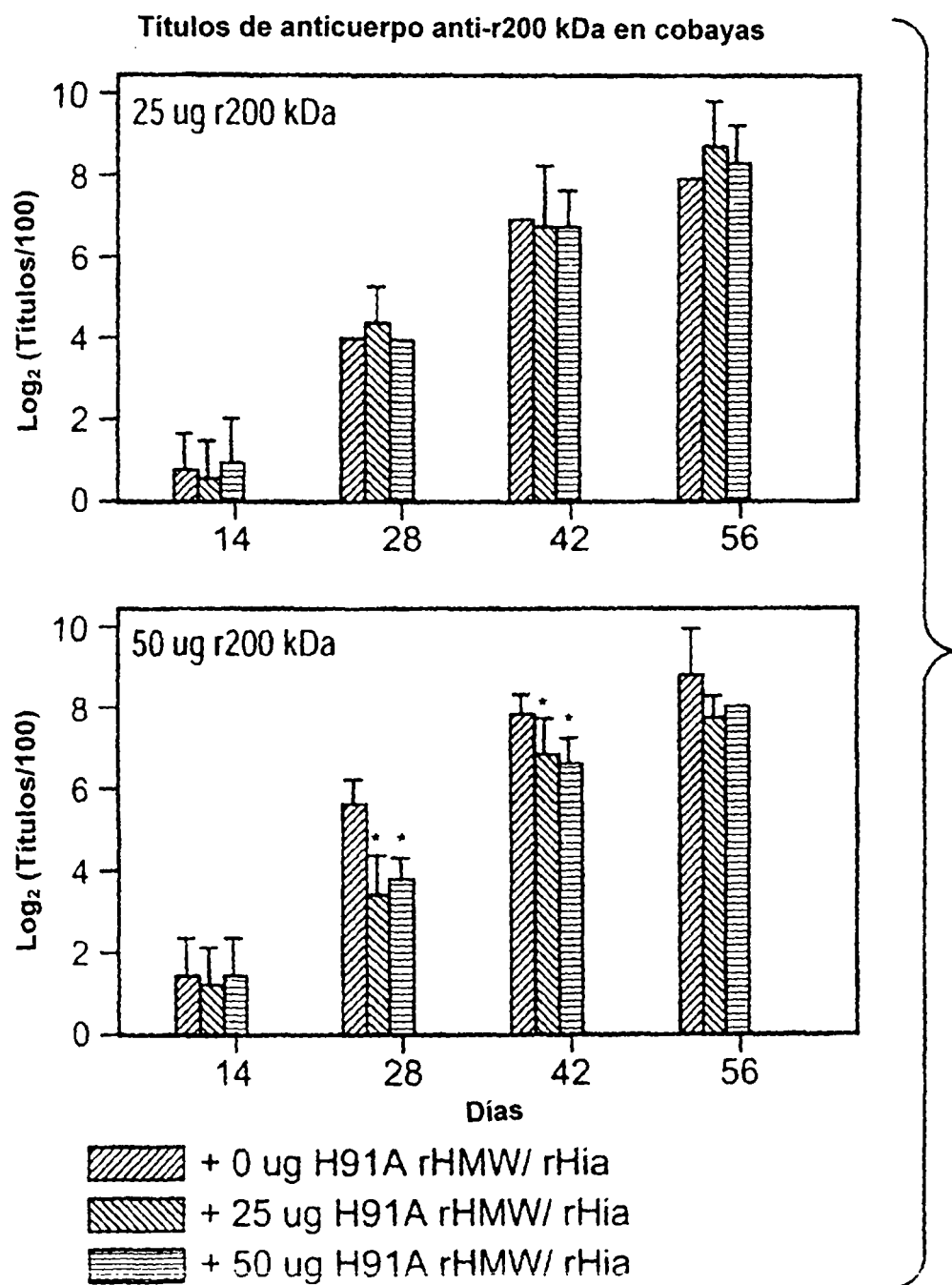


FIG.8

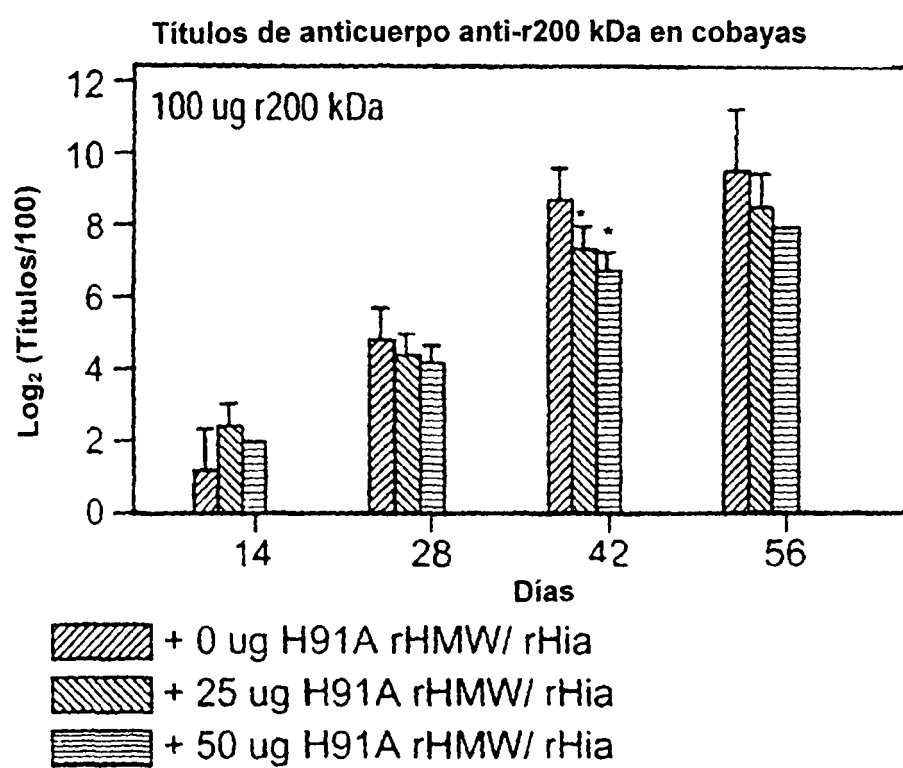
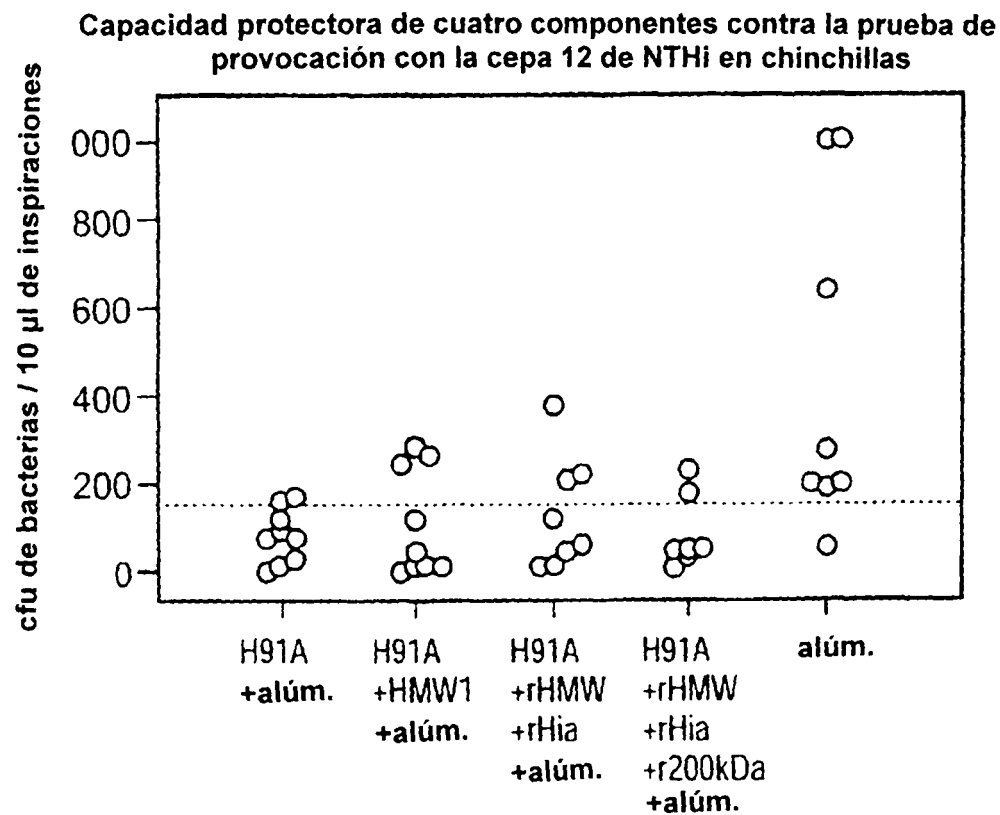
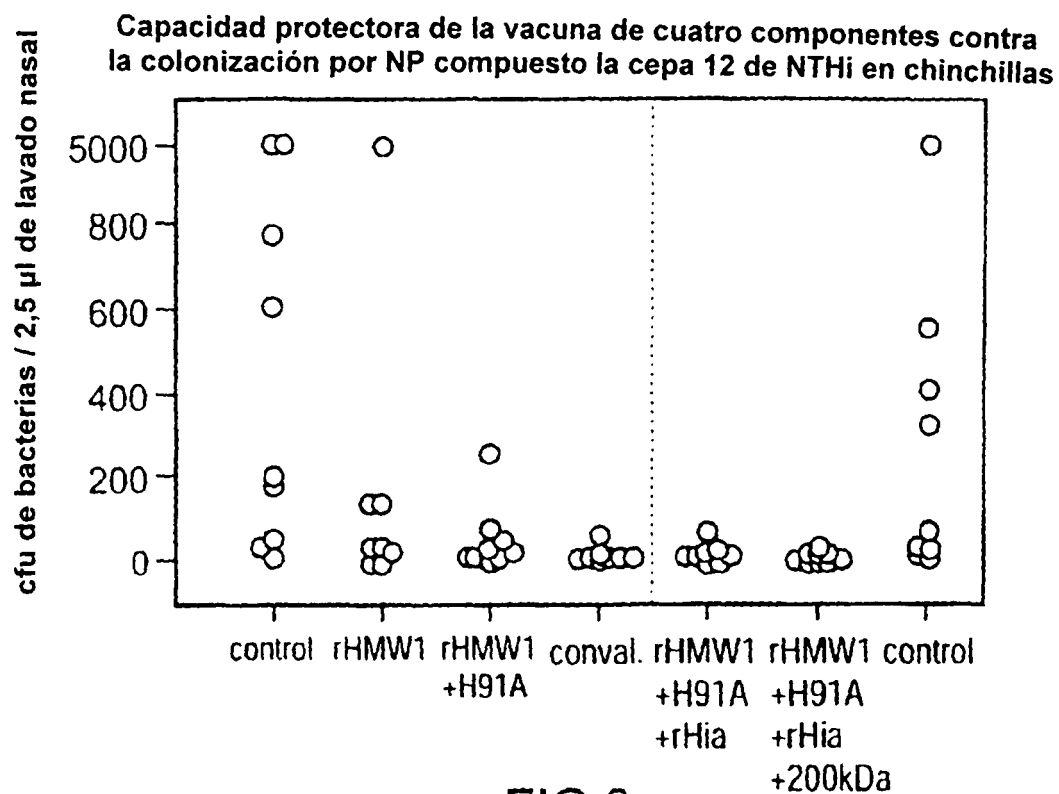


FIG.8B



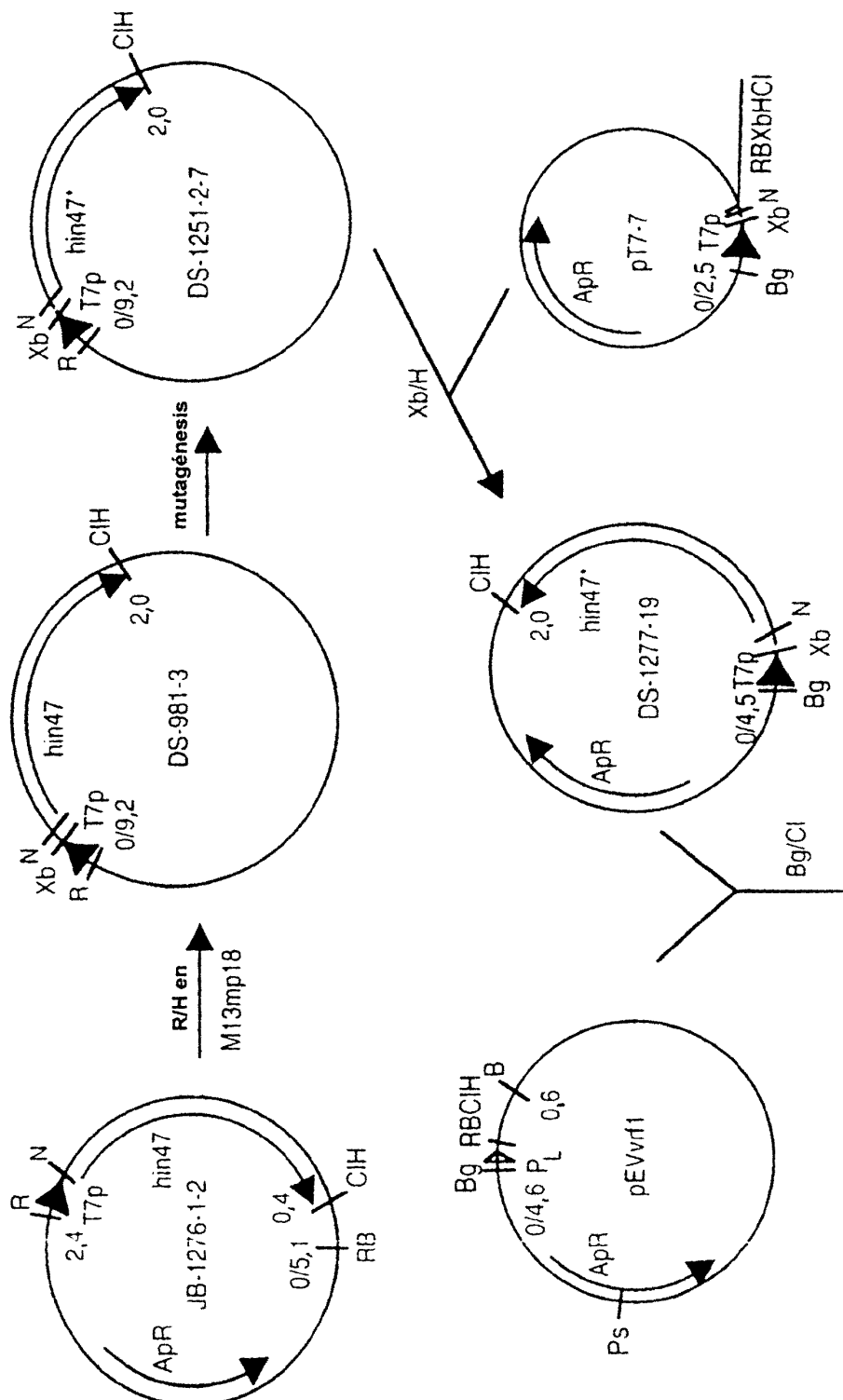


FIG.11a

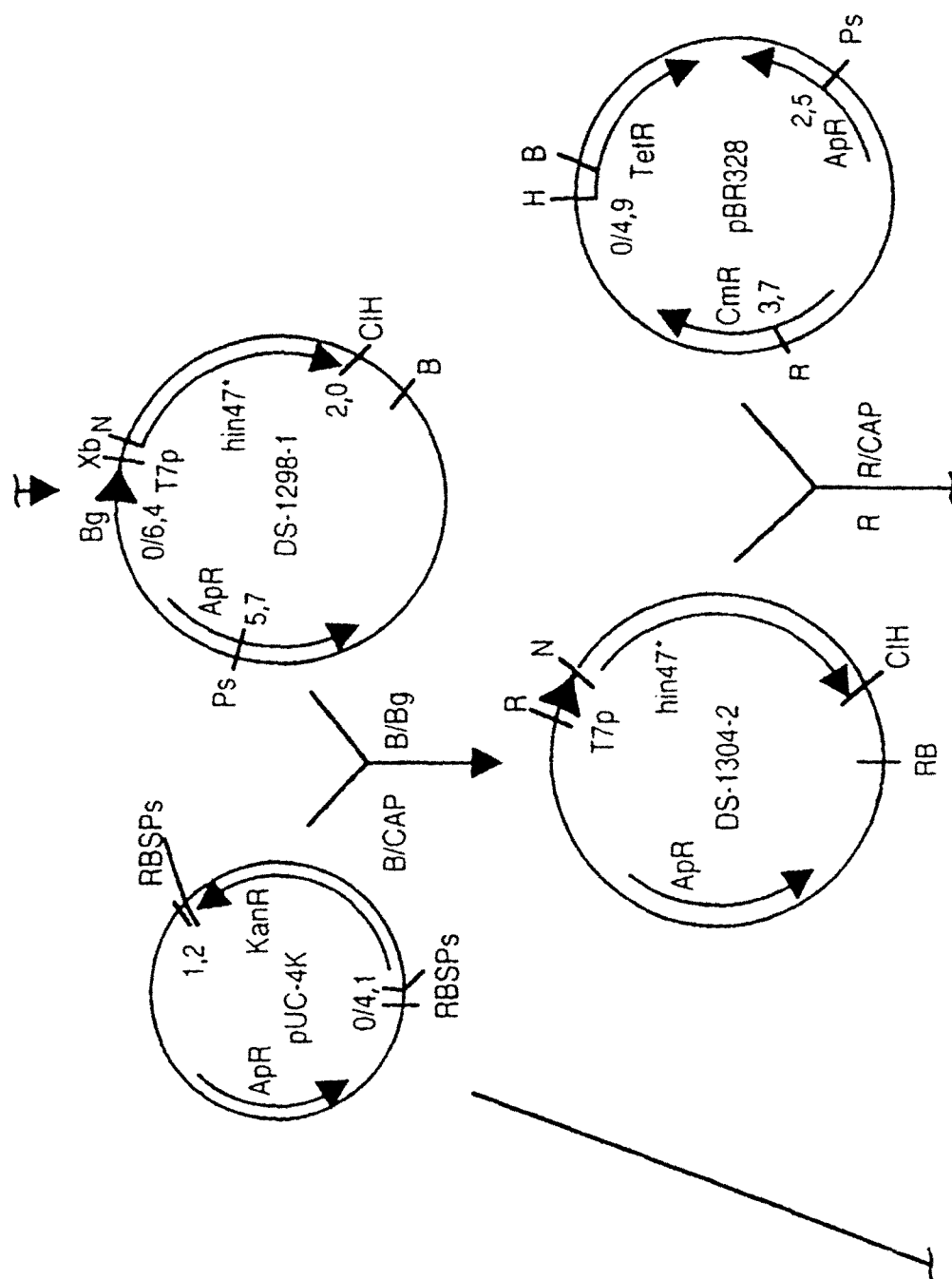


FIG.11b

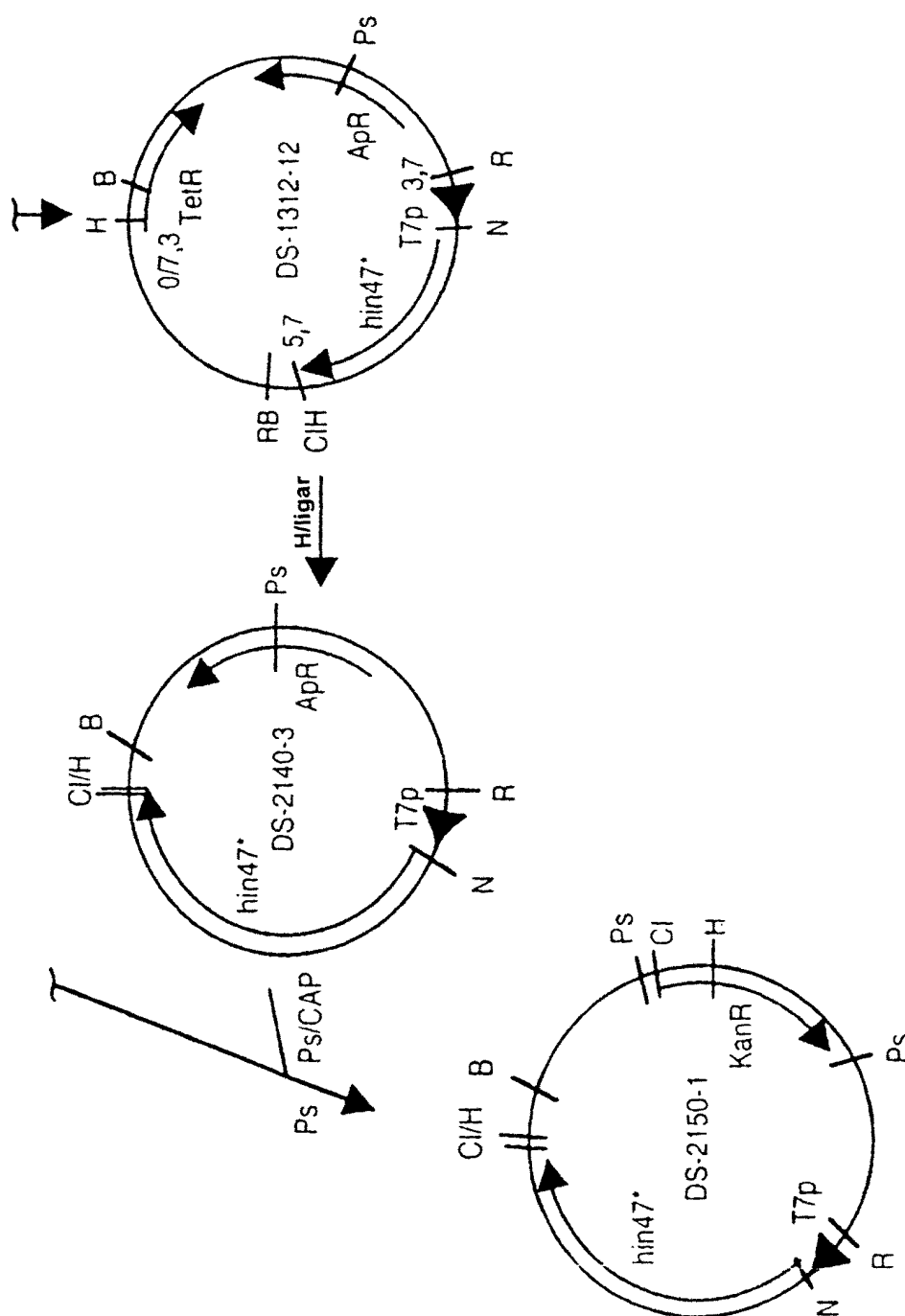


FIG.11c

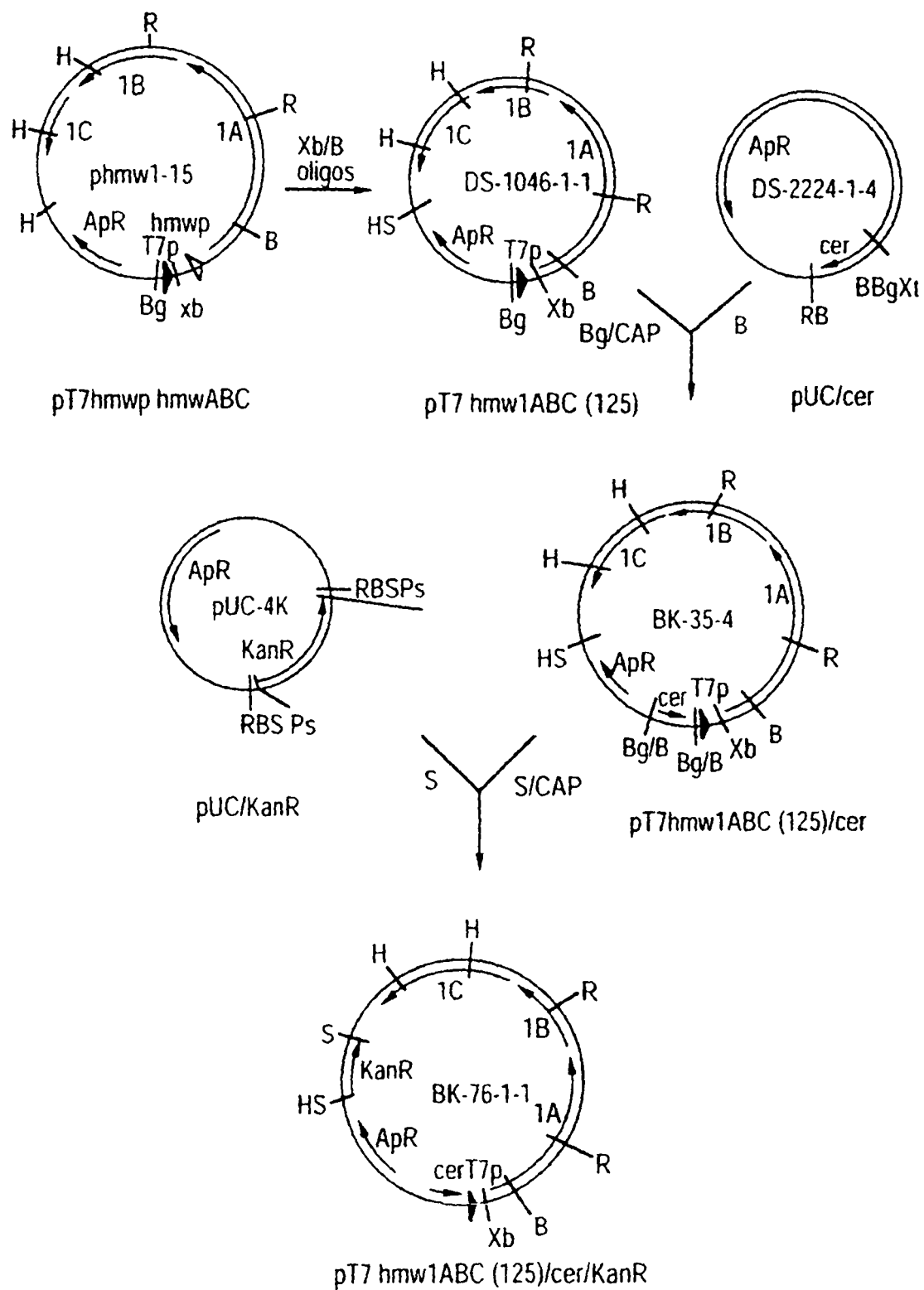


FIG.12

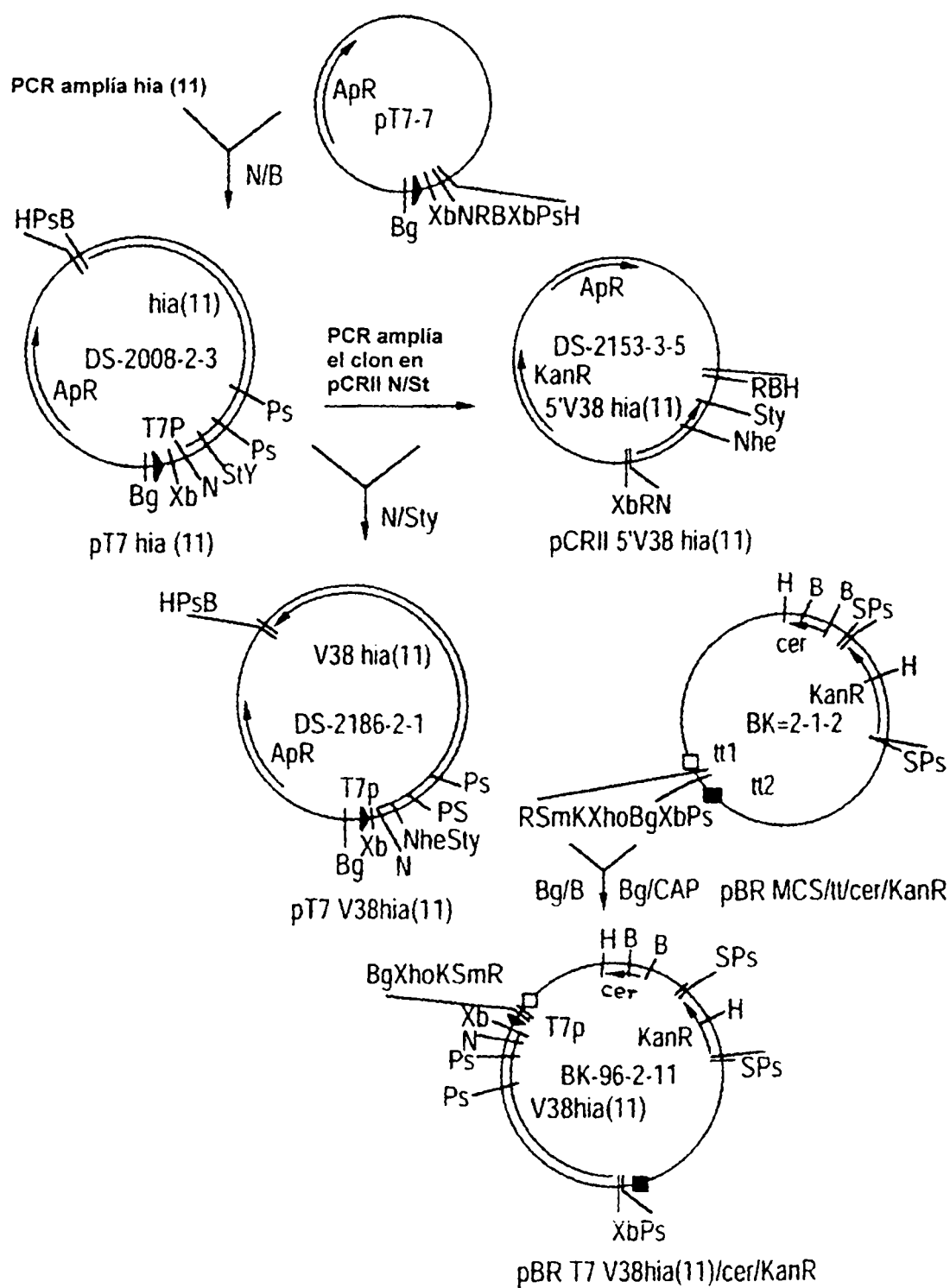


FIG.13

Construcción de pKS348

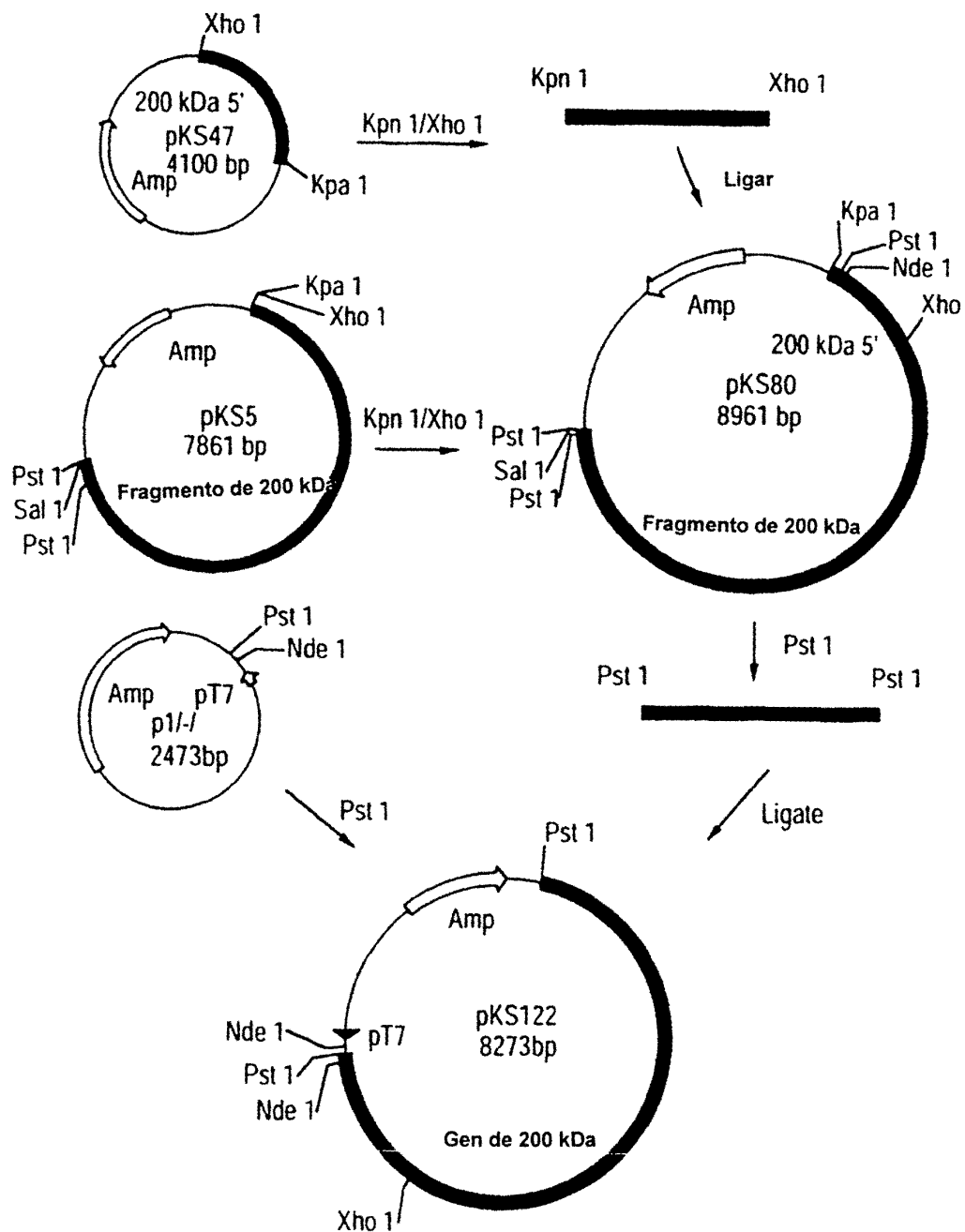


FIG.14A

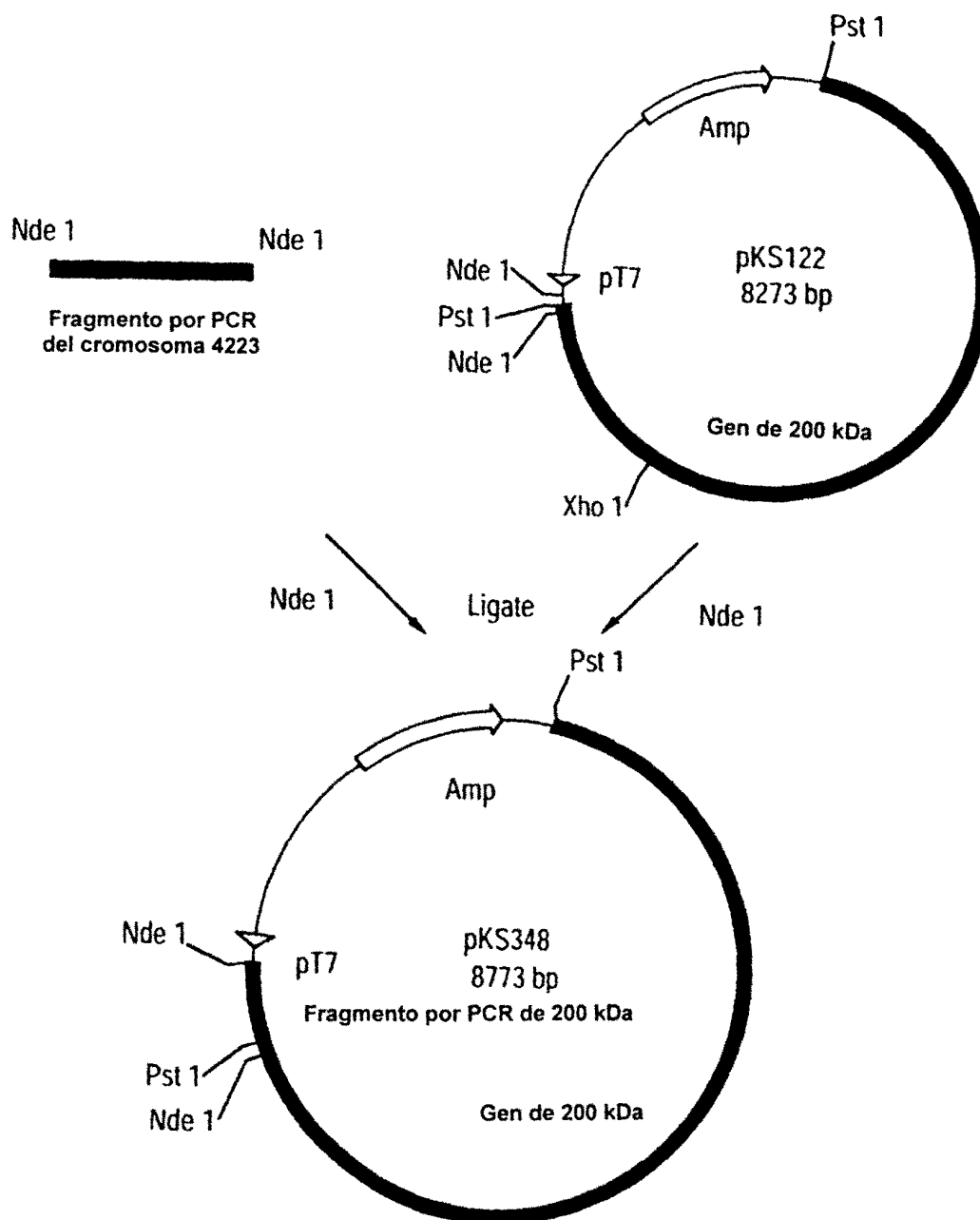


FIG.14B