



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 255**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/005 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00912626 .9**

86 Fecha de presentación : **17.03.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1163000**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2001**

54 Título: **Vacunas contra antígenos de bacterias.**

30 Prioridad: **19.03.1999 GB 9906437**
20.04.1999 GB 9909077
23.04.1999 GB 9909466
15.07.1999 GB 9916677

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**
rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es: **Capiou, Carine;**
Deschamps, Marguerite;
Desmons, Pierre, Michel;
Laferriere, Craig, Antony, Joseph;
Poolman, Jan y
Prieels, Jean-Paul

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 300 255 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

Vacunas contra antígenos de bacterias.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas frente a antígenos polisacáridos bacterianos, su fabricación u el uso de tales polisacáridos en medicinas.

10 En particular, la presente invención se refiere a conjugados de polisacáridos bacterianos en general conjugados a la proteína D de *H. influenzae*.

Antecedentes de la invención

15 *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Grampositiva responsable de una considerable morbilidad y mortalidad (en particular en jóvenes y ancianos), causante de enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteriemia y meningitis, y enfermedades asociadas con colonización, tales como otitis media aguda. Se estima que el índice de neumonía neumocócica en EE.UU. por personas mayores de 60 años de edad es de 3 a 8 por 100.000. En el 20% de los casos esto conduce a bacteriemia y otras manifestaciones tales como meningitis, con un índice de mortalidad cercano al
20 30%, incluso con tratamiento antibiótico.

El neumococo está encapsulado en un polisacárido químicamente unido que confiere especificidad de serotipo. Existen 90 serotipos conocidos de neumococos y la cápsula es el principal determinante de la virulencia de los neumococos, dado que la cápsula no sólo protege la superficie interna de la bacteria del complemento sino que en sí misma
25 es poco inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos independientes de las células T y no se pueden procesar o presentar sobre las moléculas del MHC para interactuar con las células T. No obstante, pueden estimular el sistema inmunitario a través de un mecanismo alternativo que implica el sobrecruzamiento de los receptores de superficie en las células B.

30 En varios experimentos se ha mostrado que la protección contra la enfermedad invasiva por neumococos se correlaciona con más fuerza con anticuerpos específicos de la cápsula, y la protección es específica de serotipo.

Las vacunas basadas en los antígenos polisacáridos son bien conocidas en la técnica. Cuatro que están autorizadas para el uso en seres humanos incluyen el polisacárido Vi de *Salmonella typhi*, el polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae*, la vacuna meningocócica tetravalente compuesta por los serotipos A; C, W135 e Y, y la vacuna neumocócica 23-valente compuesta por los polisacáridos correspondientes a los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33 (que representa al menos un 90% de los aislamientos
35 neumocócicos en sangre).

40 Las últimas tres vacunas confieren protección contra bacterias causantes de infecciones respiratorias que tienen como resultado una morbilidad y mortalidad graves en lactantes, aunque estas vacunas no se han autorizado para usar en niños menores de dos años de edad porque son inadecuadamente inmunogénicas en este grupo de edad [Peltola y col., (1984), N. Engl. J. Med. 310: 1561-1566]. *Streptococcus pneumoniae* es la causa más frecuente de enfermedad bacteriana invasiva y de otitis media en lactantes y niños pequeños. Asimismo, los ancianos presentan malas respuestas a las vacunas neumocócicas [Roghamann y col., (1987), J. Gerontol. 42: 265-270], de ahí la mayor incidencia de
45 neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62: 271-285].

Entre las estrategias que se han diseñado para superar esta falta de inmunogenicidad en lactantes se incluyen la unión del polisacárido a proteínas inmunogénicas grandes, que proporcionan ayuda de células T inespecífica y
50 que inducen memoria inmunológica contra el antígeno polisacárido al que está conjugado. En la actualidad se están evaluando la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de las vacunas neumocócicas con conjugados glicoproteicos en varios grupos de edad.

A) *Vacunas polisacáridas neumocócicas*

55 La vacuna neumocócica no conjugada 23-valente ha mostrado una amplia variación en cuanto a eficacia clínica, del 0% al 81% (Fedson y col. (1994) Arch Intern Med. 154: 2531-2535). La eficacia parece estar relacionada con el grupo de riesgo que se está inmunizando, tal como los ancianos, con enfermedad de Hodgkin, con esplenectomía, con drepanocitosis y con agammaglobulinemia (Fine y col. (1994) Arch Intern Med. 154: 2666-2677) y también con la manifestación de la enfermedad. La vacuna 23-valente no demuestra protección contra las enfermedades neumonía
60 neumocócica (En ciertos grupos de riesgo, tal como los ancianos) y otitis media.

Por tanto, existe una necesidad de mejores composiciones de vacuna neumocócica, en particular unas que sean más eficaces en la prevención o mejora de la enfermedad neumocócica (en particular neumonía) en ancianos y en niños
65 pequeños.

La presente invención proporciona tal vacuna mejorada.

ES 2 300 255 T3

B) Composiciones seleccionadas de conjugado polisacárido neumocócico + 3D-MPL

En general está aceptado que la eficacia protectora de la vacuna neumocócica no conjugada comercializada está más o menos relacionada con la concentración de anticuerpos inducidos por la vacunación; de hecho, la autorización de los 23 polisacáridos se aceptó únicamente por la inmunogenicidad de cada componente polisacárido (Ed. Williams y col., New York Academy of Sciences 1995, pág. 241-249). Por tanto, la posterior potenciación de las respuestas de anticuerpos frente a los polisacáridos neumocócicos podría incrementar el porcentaje de lactantes y ancianos que responden con niveles protectores de anticuerpos a la primera inyección de polisacárido o de conjugado de polisacárido y podría reducir la dosis y el número de inyecciones requeridas para inducir inmunidad protectora frente a las infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

Desde principios del siglo XX, los investigadores han experimentado con un enorme número de compuestos que pueden añadirse a los antígenos para mejorar su inmunogenicidad en las composiciones de vacunas [revisado en M.F. Powell y M.J. Newman, Plenum Press, NY, "Vaccine Design- the Subunit and Adjuvant Approach" (1995) Capítulo 7 "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients"]. Muchos son muy eficaces, pero causan importantes reacciones adversas locales y sistémicas que impiden su uso en composiciones de vacunas humanas. Los adyuvantes con base de aluminio (tal como alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio), descritos por primera vez en 1926, siguen siendo los únicos adyuvantes inmunológicos usados en las vacunas humanas autorizadas en Estados Unidos.

Los adyuvantes con base de aluminio son ejemplos de la clase portadora de adyuvantes que funciona mediante el "efecto depot" que induce. El antígeno se adsorbe por su superficie y cuando la composición se inyecta, el adyuvante y el antígeno no se disipan inmediatamente en la corriente sanguínea, en su lugar la composición persiste en el ambiente local de la inyección y se produce una respuesta inmunitaria más pronunciada. Tales adyuvantes portadores tienen la conocida ventaja adicional de ser adecuados para estabilizar antígenos propensos a la degradación, por ejemplo algunos antígenos polisacáridos.

3D-MPL es un ejemplo de un adyuvante no portador. Su nombre completo es lípido A 3-O-desacilado monofosforilo (o lípido A 3-des-O-acilado monofosforilo o lípido A 3-O-desacil-4'-monofosforilo) y se denomina 3D-MPL para indicar que la posición 3 de la glucosalina reductora terminal está des-O-acilada. Para su preparación, véase el documento GB 2220211 A. Químicamente es una mezcla de lípido A 3-desacilado monofosforilo con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Originariamente se fabricó a principios de la década de 1990, cuando el procedimiento para 3-O-desacilar el derivado 4'-monofosforilo del lípido A (MPL) condujo a una molécula con una toxicidad más atenuada sin cambios en la actividad inmunoestimulante.

El 3D-MPL se ha usado como adyuvante bien por si solo o, preferentemente, combinado con un adyuvante portador tipo depot tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o emulsiones de aceite en agua. En tales composiciones, el antígeno y el 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, lo que permite una liberación más eficaz de las señales antigénicas e inmunoestimuladoras. Los estudios han demostrado que el 3D-MPL es capaz de potenciar más la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en alumbre [Thoelen y col. Vaccine (1998) 16: 708-14; documento EP 689454-B1]. Tales combinaciones también se prefieren en la técnica para antígenos que son propensos a la adsorción (por ejemplo, conjugados polisacáridos bacterianos), donde la adsorción en alumbre tiende a estabilizar el antígeno. Los adyuvantes precipitados basados en aluminio se usan principalmente como los únicos adyuvantes que en la actualidad se usan en las vacunas humanas autorizadas. En consecuencia, en la técnica se favorecen las vacunas que contienen 3D-MPL en combinación con adyuvantes basados en aluminio debido a su facilidad de desarrollo y a la velocidad de la introducción en el mercado.

El MPL (no 3-desacilado) se ha evaluado como adyuvante con varios antígenos de vacunas monovalentes conjugadas con polisacáridos. La coinfección de MPL en solución salina potenció la respuesta de anticuerpos en suero para cuatro conjugados polisacáridos monovalentes: PS 6B neumocócico-toxoide tetánico, PS 12 neumocócico-toxoide de la difteria y *S. aureus* tipo 5 y *S. aureus* tipo 8 conjugado con la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* [Scheneerson y col., J. Immunology (1991) 147: 2136-2140]. Se enseñó que las respuestas potenciadas eran específicas de antígeno. El MPL en una emulsión de aceite en agua (un adyuvante de tipo portador) potenció de forma consistente el efecto del MPL en solución salina debido a la presencia de MPL y antígeno en la misma estructura particulada y se consideró que era el sistema de adyuvantes de elección para la liberación óptima de otras vacunas con conjugados polisacáridos.

Devi y col. [Infect. Immun (1991) 59: 3700-7] evaluó el efecto adyuvante del MPL (no 3-desacilado) en solución salina sobre la respuesta de anticuerpos murina a un conjugado TT del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. Cuando MPL se usó junto con el conjugado sólo se produjo un incremento pequeño en la respuesta específica de IgM e IgG al PS; no obstante, el MPL tuvo un efecto mucho mayor cuando se administró 2 días después del conjugado. La viabilidad del uso de un esquema de inmunización que requiera un retraso en la administración de MPL con respecto al antígeno, en especial en lactantes, es cuestionable. El efecto adyuvante de MPL con polisacáridos y conjugados polisacárido-proteína parece depender de la composición. De nuevo, la incorporación de MPL en un sistema adecuado de administración de liberación lenta (por ejemplo, usando un adyuvante portador) proporciona un efecto adyuvante más duradero y sortea el problema de la cronología y de la administración retrasada.

En resumen, la tecnología punta ha enseñado que, para antígenos polisacáridos o de conjugado-polisacárido concretos, en los que se usa MPL o 3D-MPL como adyuvante, es ventajosamente usado junto con un adyuvante portador (por ejemplo, los adyuvantes basados en aluminio) con el fin de maximizar su efecto inmunoestimulador.

ES 2 300 255 T3

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que, para ciertos conjugados polisacáridos neumocócicos, la inmunogenicidad de la composición de la vacuna es significativamente mayor cuando el antígeno se formula con 3D-MPL solo en lugar de con 3D-MPL junto con un adyuvante portador (tal como un adyuvante basado en aluminio). Además, la mejora observada es independiente de la concentración de 3D-MPL usada y si los conjugados concretos están en una composición monovalente o si se combinan para formar una composición polivalente.

C) Conjugados de polisacárido bacteriano-proteína D

Como se ha mencionado antes, las vacunas basadas en antígenos polisacáridos son bien conocidos en la técnica. Las vacunas polisacáridas autorizadas mencionadas antes han demostrado diferente eficacia clínica. Se ha estimado que la vacuna polisacárida Vi tiene una eficacia entre el 55% y el 77% en la prevención de la fiebre tifoidea confirmada mediante cultivo (Plotkin y Cam, (1995) Arch Intern Med 155: 2293-99). Se ha mostrado que la vacuna meningocócica con polisacárido C tiene una eficacia del 79% en condiciones epidémicas (De Wals P y col., (1996) Bull World Health Organ, 74: 407-411). La vacuna neumocócica 23-valente ha mostrado una amplia variación de la eficacia clínica, del 0% al 81% (Fedson y col. (1994) Arch Intern Med. 154: 2531-2535). Como se ha mencionado antes, se acepta que la eficacia protectora de la vacuna neumocócica está más o menos relacionada con la concentración de anticuerpos inducidos por la vacunación.

Entre los problemas asociados con el enfoque polisacárido de la vacunación se encuentra el hecho de que los polisacáridos *per se* son malos inmunógenos. Entre las estrategias que se han diseñado para superar esta falta de inmunogenicidad se incluyen la unión del polisacárido a portadores proteicos grandes altamente inmunogénicos, que proporcionan ayuda de células T inespecíficas.

Ejemplos de estos portadores altamente inmunogénicos que actualmente se usan con frecuencia para la producción de inmunógenos polisacáridos incluyen el toxoide de difteria (DT o el mutante CRM197), el toxoide del tétanos (TT), hemocianina de lapa californiana (KLH) y el derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD). Snapper y col. (documento WO 96/32963) tratan la co-administración de un antígeno con lipoproteína D. D. Akkoyunlu y col. (1997) tratan los conjugados de proteína D-Hib. Lee y col. (1997) tratan el uso de conjugados neumocócicos multivalentes de proteínas-polisacáridos como vacunas. Estola y col. (1990) estudiaron la administración de una vacuna conjugada de proteína-polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B mezclada con vacunas de polisacárido capsular no conjugadas meningocócica y/o neumocócica. El documento WO 99/33488 (que es la técnica anterior a tenor del Art. 54 (3) EPC para esta invención) describe formulaciones de vacuna que comprende vacunas conjugadas de polisacáridos adyuvadas con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador.

35 Problemas asociados con portadores de uso habitual

Una serie de problemas se han asociado con cada uno de estos portadores de uso habitual, incluyendo en la producción de conjugados de GMP y también en las características inmunológicas de los conjugados.

A pesar del uso habitual de estos portadores y su éxito en la inducción de respuestas de anticuerpos anti-polisacárido, están asociados con varios inconvenientes. Por ejemplo, se sabe que se pueden suprimir respuestas inmunitarias específicas de antígeno (supresión de epítipo) mediante la presencia de anticuerpos preexistente dirigidos contra el portador, en este caso la toxina tetánica (Di John y col.; (1989) Lancet, 2: 1415-8). En la población en general, un porcentaje muy elevado de personas presentará inmunidad pre-existente a la TD y a la TTA, ya que las personas son vacunadas de forma rutinaria con estos antígenos. Por ejemplo, en el Reino Unido el 95% de los niños reciben la vacuna DTP que comprende tanto la TD como la TT. Otros autores han descrito el problema de la supresión de epítipo de vacunas peptídicas en modelos animales (Sad y col., Immunology, 1991; 74: 223-227; Schutze y col., J. Immunol. 135: 4, 1985; 2319-2322).

Además, para las vacunas que requiere un refuerzo regular, es probable que el uso de portadores altamente inmunogénicos tales como TT y DT suprima la respuesta de anticuerpos de polisacáridos tras varias inyecciones. Estas múltiples vacunaciones pueden también acompañarse de reacciones indeseables tales como hiperrespuesta de tipo retrasado (DTH).

Se sabe que la KLH es un potente inmunógeno y ya se ha usado como portador para los péptidos de IgE en ensayos clínicos humanos. No obstante, se han observado algunas reacciones adversas (reacciones de tipo DTH o sensibilización a IgE), así como las respuestas de anticuerpos contra anticuerpos.

Por tanto, la selección de una proteína portadora para una vacuna basada en polisacáridos requerirá un equilibrio entre la necesidad del uso de un portador que funcione en todos los pacientes (amplio reconocimiento de MHC), la inducción de niveles elevados de respuestas de anticuerpos anti-polisacáridos y baja respuesta de anticuerpos contra el portador.

Por tanto, los portadores usados anteriormente para las vacunas basadas en polisacáridos poseen muchas desventajas. Esto es particularmente cierto en las vacunas de combinación, cuando la supresión del epítipo es especialmente problemática si se usa el mismo portador para varios antígenos polisacáridos. En el documento WO 98151339 se usaron múltiples portadores en las vacunas de combinación con el fin de intentar superar este efecto.

ES 2 300 255 T3

La presente invención proporciona un nuevo portador para usar en la preparación de conjugados inmunogénicos basados en polisacáridos/polipéptidos, que no sufre las desventajas mencionadas anteriormente.

La presente invención proporciona una proteína D (documento EP 0 594 610 B1) de *Haemophilus influenzae*, o fragmentos de la misma, como portador para composiciones inmunogénicas basadas en polisacáridos, incluyendo vacunas. El uso de este portador es particularmente ventajoso en vacunas de combinación.

Resumen de la invención

10 A) Vacunas de polisacáridos neumocócicos

En consecuencia, la presente descripción describe una composición de vacuna, que comprende al menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* (preferentemente conjugado) y un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* o un equivalente inmunológicamente funcional de los mismos, opcionalmente con un adyuvante Th1 (un adyuvante que induce una respuesta inmunitaria Th1). Preferentemente están incluidos tanto una proteína neumocócica como el adyuvante Th1. Las composiciones de la descripción son particularmente adecuadas en el tratamiento de la neumonía en ancianos.

Las vacunas polisacáridas neumocócicas (Conjugadas o no) pueden no ser capaces de proteger contra la neumonía en la población de ancianos para los que la incidencia de la enfermedad es muy elevada. El mecanismo clave de defensa contra el polisacárido neumocócico es la opsonofagocitosis (un acontecimiento humoral mediado por células B/neutrófilos causado por la producción de anticuerpos contra el polisacárido neumocócico, con lo que la bacteria es fagocitada en última instancia), aunque partes de los mecanismos opsonicos implicados están alterados en los ancianos, es decir la producción de superóxido por los PMN (células polimorfonucleares), la producción de otras especies de oxígeno reactivas, la movilización de los PMN, la apoptosis de los PMN, la deformabilidad de los PMN. Las respuestas de anticuerpos también pueden estar alteradas en los ancianos.

Al contrario que el dogma normalmente aceptado, los niveles normales de anticuerpos anti-polisacáridos capsulares pueden no ser eficaces en la eliminación completa de las bacterias, ya que los neumococos pueden invadir las células huésped y evadir esta rama del sistema inmunitario.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que mediante la estimulación simultánea de la rama mediada por células del sistema inmunitario (por ejemplo la inmunidad mediada por células T) además de la rama humoral del sistema inmunitario (mediada por células B) se produce una sinergia (o cooperación) que es capaz de potenciar la eliminación de los neumococos del huésped. Este es un descubrimiento que ayudará a la prevención (o tratamiento) de la infección neumocócica en general, pero será particularmente importante para la prevención (o tratamiento) de la neumonía en ancianos en los que las vacunas basadas en polisacáridos no muestran eficacia.

Los presentes inventores han encontrado que ambas ramas del sistema inmunitario pueden actuar sinérgicamente de este modo si se administra un polisacárido neumocócico (preferentemente conjugado) con una proteína neumocócica (preferentemente una proteína expresada sobre la superficie de los neumococos, o secretada o liberada, que se puede procesar y presentar en el contexto del MHC de clase II y de clase I sobre la superficie de las células infectadas de mamífero). Aunque una proteína neumocócica puede desencadenar inmunidad mediada por célula por sí misma, los inventores también han descubierto que la presencia de un adyuvante inductor de Th1 en la formulación de la vacuna ayuda a esta arma del sistema inmunitario y, sorprendentemente, además potencia la sinergia entre ambas ramas del sistema inmunitario.

50 B) Composiciones seleccionadas de conjugados de polisacáridos neumocócicos + 3D-MPL

En consecuencia, la presente descripción también describe una composición antigénica que comprende uno o más conjugados de polisacáridos neumocócicos adyuvados con 3D-MPL y sustancialmente desprovista de adyuvantes con base de aluminio, en la que al menos uno de los conjugados de polisacáridos neumocócicos es significativamente más inmunogénico en las composiciones que comprenden 3D-MPL en comparación con las composiciones que comprenden 3D-MPL junto con un adyuvante con base de aluminio.

Las formas de realización preferidas proporcionadas con composiciones antigénicas que comprenden conjugados de uno o más de los siguientes polisacáridos capsulares neumocócicos: serotipo 4, 6B, 18C, 19F y 23F. En tales composiciones, cada uno de los polisacáridos son, sorprendentemente, más inmunogénicos en las composiciones que comprenden 3D-MPL solo en comparación con las composiciones que comprenden 3D-MPL y un adyuvante con base de aluminio.

Por tanto, la presente descripción describe una composición antigénica que comprende el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4, 6B, 18C, 19F o 23F conjugado con una proteína inmunogénica y un adyuvante 3D-MPL, en la que la composición está sustancialmente desprovista de adyuvantes con base de aluminio.

En una segunda forma de realización, la presente descripción describe una combinación de composición antigénica sustancialmente desprovista de adyuvantes con base de aluminio y que comprende adyuvante 3D-MPL y dos o más

ES 2 300 255 T3

conjugados de polisacárido neumocócico escogidos del grupo compuesto por: serotipo 4; serotipo 6B; serotipo 18C; serotipo 19F; y serotipo 23F.

C) Conjugados polisacárido bacteriano-proteína D

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una pluralidad de antígenos polisacáridos que consisten en un antígeno polisacárido derivado de una bacteria patogénica conjugada con la proteína D de *Haemophilus influenzae* o un fragmento de proteína D del mismo.

Descripción de la invención

A) Vacunas polisacáridas neumocócicas

La presente invención proporciona una vacuna mejorada, Particularmente para la prevención o mejora de la infección neumocócica de los ancianos (y/o lactantes y niños pequeños).

En el contexto de la invención, un paciente se considera anciano si tiene 55 años de edad o más, normalmente más de 60 años y, más normalmente, más de 65 años.

Por tanto, en una forma de realización de la descripción se proporciona una composición de vacuna adecuada para usar en ancianos (y/o lactantes o niños pequeños), que comprende al menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y al menos un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae*.

En una segunda, preferida, forma de realización, la presente invención describe una vacuna (adecuada para la prevención de la neumonía en ancianos), que comprende al menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y al menos un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* y un adyuvante Th1.

Se prevé que tal vacuna también será útil en el tratamiento de la infección neumocócica (por ejemplo otitis media) en otros grupos de alto riesgo de la población, tal como lactantes o niños pequeños.

En una tercera forma de realización se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno polisacárido neumocócico y un adyuvante Th1.

Antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de la invención

Normalmente, la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá antígenos polisacáridos conjugados, en la que los polisacáridos derivan de al menos cuatro serotipos de neumococos. Preferentemente, los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. Más preferentemente, en la composición se incluyen al menos 7 serotipos, por ejemplo los derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Todavía más preferentemente, en la composición se incluyen al menos 11 serotipos, por ejemplo la composición en una forma de realización incluye polisacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6b, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23 F (preferentemente conjugados). En una forma de realización preferida de la invención se incluyen al menos 13 antígenos polisacáridos conjugados, aunque la invención también contempla más antígenos polisacáridos, por ejemplo 23 valente (tal como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 19^a, 11^a, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19^a, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

Para la vacunación de ancianos (por ejemplo para la prevención de la neumonía) es ventajoso incluir los serotipos 8 y 12F (y más preferentemente los 15 y 22 también) en la composición antigénica 11 valente descrita antes, para formar una vacuna 15 valente, mientras que para lactantes y niños pequeños (en los que la otitis media es motivo de más preocupación) se incluyen de forma ventajosa los serotipos 6A y 19A, para formar una vacuna 13 valente.

Para la prevención/mejora de la neumonía en la población de ancianos (+55 años) y la otitis media en lactantes (hasta 18 meses de edad) y niños pequeños (normalmente de 18 meses a 5 años), es una forma de realización preferida combinar un polisacárido multivalente de *Streptococcus pneumoniae* tal y como se describe en la presente memoria descriptiva descrito con una proteína de *Streptococcus pneumoniae* o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma.

Proteínas neumocócicas

Para los fines de esta descripción, "equivalente inmunológicamente funcional" se define como un péptido de proteína que comprende al menos un epítipo protector de las proteínas de la descripción. Tales epítipos están, característicamente, expuestos en la superficie, altamente conservados y pueden provocar una respuesta de anticuerpos bactericida en un huésped o prevenir los efectos tóxicos. Preferentemente, el equivalente funcional tiene al menos 15, y preferentemente 30 o más, aminoácidos contiguos de la proteína de la descripción. Más preferentemente se pueden usar fragmentos, deleciones de la proteína, tal como variantes de deleción transmembrana de la misma (es decir, el uso del dominio extracelular de las proteínas), fusiones, derivados química o genéticamente destoxificados y similares con la condición de que puedan elevar sustancialmente la misma respuesta inmunitaria como la proteína nativa.

ES 2 300 255 T3

Proteínas preferidas son las proteínas neumocócicas que están expuestas en la superficie externa del neumococo (capaz de ser reconocido por un sistema inmunitario del huésped durante al menos parte del ciclo de la vida del neumococo), o son proteínas secretadas o liberadas por el neumococo. Más preferentemente, la proteína es una toxina, adhesina, transductor de señal de 2 componentes o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos.

Proteínas particularmente preferidas a incluir en tal vacuna de combinación incluyen, entre otros: neumolisina (preferentemente destoxificada por tratamiento químico o mutación) [Mitchell y col. Nucleic Acid Res. 1990 Jul 11; 18 (13): 4010 “Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2”., Mitchell y col. Biochem Biophys Acta 1989 Ene 23; 1007(1): 67-72 “Expresión of the pneumolysin gen in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties”., documento WO 96/05859 (A. Cyanamid), documento WO 90/06951 (Paton y col.), documento WO 99/03884 (NAVA)];

PspA y variantes de delección transmembrana del mismo (documento US 5804193- Brilles y col.); PspC y variantes de delección transmembrana del mismo (documento WO 97/09994)- Brilles y col.); PsaA y variantes de delección transmembrana del mismo (Berry y Paton, Infect Immun 1996 Dic; 64 (12): 5255-62 “Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*”); proteínas de unión a colina neumocócica y variantes de delección transmembrana de las mismas; CbpA y variantes de delección transmembrana del mismo (documento WO 97/41151; documento WO 99/51266); Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64: 3544); HSP70 (documento WO 96/40928); PcpA (Sánchez-Beato y col. FEMS Microbiol Lett 1998, 164: 207-14); proteína similar a M, solicitud de patente SB N° EP 0837130; y adhesina 18627, solicitud de patente SB N° EP 0834568.

Las proteínas usadas en la presente descripción se seleccionan, preferentemente, del grupo neumolisina, PsaA, PspA, PspV, CbpA o una combinación de dos o más de tales proteínas. La presente invención también abarca equivalentes inmunológicamente funcionales de tales proteínas (como se ha definido antes).

En la composición, la proteína puede ayudar a inducir respuesta mediada por células T contra la enfermedad neumocócica, particularmente requerida para la protección contra neumonía, que coopera con la rama humoral del sistema inmunitario para inhibir la invasión por neumococos, y estimular la opsonofagocitosis.

Otras ventajas de incluir el antígeno proteico es la presentación de más antígenos para el proceso de opsonofagocitosis y la inhibición de la adhesión bacteriana (si se usa una adhesina) o la neutralización de la toxina (si se usa una toxina).

En consecuencia, en una forma de realización se proporciona una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* que comprende una vacuna de conjugado de polisacárido neumocócico que comprende antígenos polisacáridos derivados de al menos cuatro serotipos, preferentemente al menos siete serotipos, más preferentemente al menos once serotipos, y al menos uno, pero preferentemente dos, proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Preferentemente, una de las proteínas es neumolisina o PsaA o PspA o CbpA (más preferentemente neumolisina destoxificada). Una combinación preferida contiene al menos neumolisina o un derivado de la misma y PspA.

Como se ha mencionado antes, un problema asociado con el enfoque del polisacárido de la vacunación es el hecho de que los polisacáridos *per se* son malos inmunógenos. Para superar esto, los polisacáridos se pueden conjugar con portadores proteicos, que proporcionan ayuda de células T inespecífica. Por tanto, se prefiere que los polisacáridos utilizados en la invención estén unidos a tal portador proteico. Ejemplos de tales portadores que en la actualidad se usan habitualmente para la producción de inmunógenos polisacáridos incluyen los toxoides de difteria y del tétanos (TD, TD CRM197 y TT, respectivamente), hemocianina de lapa californiana (KLH), OMPC de *N. meningitidis* y el derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD).

No obstante, con cada uno de estos portadores usados habitualmente se asocia una serie de problemas (véase la sección “Problemas asociados con portadores de uso habitual”, anteriormente).

La presente invención proporciona en una forma de realización preferida un nuevo portador para usar en la preparación de constructos inmunógenos basados en polisacáridos, que no sufre estas desventajas. El portador preferido para las composiciones inmunogénicas basadas en polisacáridos neumocócicos (o vacunas) es la proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento EP 594610-B), o fragmentos de la misma. Fragmentos adecuados para usar incluyen fragmentos que abarcan epítomos de T colaboradores. En particular, un fragmento de proteína D contendrá preferentemente el 1/3 del extremo N de la proteína.

Otro portador preferido para el polisacárido neumocócico es la propia proteína neumocócica (como se ha definido antes en la sección “Proteínas neumocócicas”).

Las vacunas de la presente invención están, preferentemente, adyuvadas. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (Alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniómicamente derivados, o polifosfazenos,

ES 2 300 255 T3

Se prefiere que el adyuvante se seleccione de modo que sea un inductor preferencial de un tipo de respuesta TH1 para ayudar a la rama de la respuesta inmunitaria mediada por células.

Adyuvantes TH1 de la invención

5

Niveles elevados de las citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno dado, mientras que niveles elevados de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humerales al antígeno.

10

Es importante recordar que la distinción de respuesta inmunitaria de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. No obstante, a menudo es conveniente considerar a las familias de citocinas en términos de lo descrito en clones de células T CD4 +ve por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, pág. 145-172). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se asocian con la producción de las citocinas IFN- γ e IL-2 por los linfocitos T. Otras citocinas a menudo directamente asociadas con la inducción de las respuestas inmunitarias de tipo Th1 no están producidas por las células T, tales como la IL-2. En contraste con ello, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Sistemas adyuvantes adecuados que estimulan una respuesta predominantemente Th1 incluyen el lípido A monofosforilo o un derivado del mismo, en particular lípido A 3-des-O-acilado monofosforilo, y una combinación de lípido A monofosforilo, preferentemente lípido A 3-des-O-acilado monofosforilo (3D-MPL) junto con una sal de aluminio.

15

20

Un sistema potenciado implica la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL tal y como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 se inactiva con colesterol como se describe en el documento 96/33739.

25

Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

30

Preferentemente, la vacuna comprende adicionalmente una saponina, más preferentemente QS21. La formulación también puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol (documento WO 95/17210).

35

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir una formulación de vacuna que comprende mezclar una proteína de la presente invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como 3D-MPL.

Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilada (documento WO 96/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son adecuados para usar en la presente invención.

40

Composiciones particularmente preferidas de la descripción comprenden uno o más polisacáridos neumocócicos conjugados, una o más proteínas neumocócicas y un adyuvante Th1. La inducción de una respuesta mediada por células mediante una proteína neumocócica (como se ha descrito antes) y la cooperación entre ambas ramas del sistema inmunitario pueden recibir ayuda usando tal adyuvante Th1, lo que tiene como resultado una vacuna particularmente eficaz contra la enfermedad neumocócica en general y, de un modo importante, contra la neumonía neumocócica en ancianos.

45

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un inmunógeno o vacuna como se ha descrito en la presente memoria descriptiva para usar en medicina.

50

En otro aspecto más de la invención, se proporciona una composición que comprende un conjugado neumocócico y un adyuvante Th1 (preferentemente 3D-MPL) que es capaz de seroconvertir o inducir una respuesta humoral de anticuerpos contra el antígeno polisacárido dentro de una población de no respondedores.

55

Se sabe que el 10-30% de la población son no respondedores a la inmunización con polisacáridos (no responden a más del 50% de los serotipos en una vacuna) (Konradsen y co., Scand. J. Immun 40: 251 (1991); Rodríguez y col., JI², 173: 1347 (1996)). Esto puede también ser el caso para las vacunas conjugadas (Musher y col., Clin. Inf. Dis. 27: 1487 (1998)). Esto puede ser particularmente serio para áreas de alto riesgo de la población (lactantes, niños pequeños y ancianos).

60

Los presentes inventores han encontrado que una combinación de un polisacárido neumocócico conjugado (que es propenso a una respuesta baja en una población concreta) con un adyuvante Th1 (véase "Adyuvantes Th1 de la invención", anteriormente) puede superar, sorprendentemente, esta falta de respuesta. Preferentemente, se debe usar 3D-MPL, y más preferentemente 3D-MPL desprovisto de adyuvante basado en aluminio (que proporciona una respuesta todavía mejor). Por tanto, la presente invención proporciona tales composiciones y además proporciona un uso de un adyuvante Th1 en la fabricación de un medicamento que comprenda antígenos polisacáridos neumocócicos conjugados, para el tratamiento contra (o protección de) la enfermedad neumocócica en individuos que sean no respondedores al antígeno polisacárido.

65

ES 2 300 255 T3

En una forma de realización existe un uso de una cantidad segura y eficaz de un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y un adyuvante Th1, o una proteína neumocócica (y preferentemente ambos) en la fabricación de una vacuna, como se describe en la presente memoria descriptiva, para la prevención o mejora de la neumonía en un humano anciano.

En otra forma de realización se proporciona un uso de una cantidad segura y eficaz de un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* o un adyuvante Th1 (y preferentemente ambos) en la fabricación de una vacuna para la prevención o mejora de la otitis media en lactantes y niños pequeños.

En los procedimientos de la invención, como se ha descrito antes, el antígeno polisacárido está presente en forma de un conjugado proteico polisacárido.

Preparaciones de vacuna de la invención

Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar un mamífero susceptible a la infección por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de la neumonía o la otitis media (dado que el transporte nasofaríngeo de los neumococos puede prevenirse de un modo más eficaz, lo que atenúa la infección en su etapa más precoz).

La cantidad de antígeno conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona en forma de una cantidad que induce una respuesta inmunoprotector sin efectos secundarios adversos significativos en las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplee y cómo se presente. En general, cabe esperar que cada dosis comprenda 0,1-100 μg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 μg , preferentemente 0,1-10 μg , de los cuales de 1 a 5 μg es el intervalo más preferible.

El contenido de los antígenos proteicos en la vacuna estará normalmente en el intervalo de 1-100 μg , preferentemente 5-50 μg , más normalmente en el intervalo de 5-25 μg .

Cantidades óptimas de componentes para una vacuna concreta se pueden establecer mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

En general, la preparación de vacunas se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (Eds. Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Fullerton describe la encapsulación dentro de liposomas se describe en la patente de EE.UU. 4.235.877.

B) *Composiciones seleccionadas de conjugado polisacárido neumocócico + 3D-MPL*

Para los fines de esta descripción, el término "conjugados polisacáridos neumocócicos de la descripción" describe los conjugados de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* que son más inmunogénicos en composiciones que comprenden 3D-MPL en comparación con las composiciones que comprenden 3D-MPL junto con un adyuvante con base de aluminio (por ejemplo, conjugados de serotipo 4; serotipo 6B, serotipo 18C; serotipo 19F o serotipo 23F).

Para los fines de esta descripción, el término "sustancialmente desprovisto de adyuvantes con base de aluminio" describe una composición que no contiene suficiente adyuvante con base de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio y, particularmente, fosfato de aluminio) para causar cualquier disminución en la inmunogenicidad de un conjugado polisacárido neumocócico de la descripción en comparación con una composición equivalente que comprende 3D-MPL sin adición de adyuvante con base de aluminio. Preferentemente, la composición antigénica deberá contener adyuvante que consista esencialmente 3D-MPL. Las cantidades de adyuvante con base de aluminio añadidas por dosis deberán ser, preferentemente, inferiores a 50 μg , más preferentemente inferiores a 30 μg , todavía más preferentemente inferiores a 10 μg , y más preferentemente no se añade adyuvante con base de aluminio a las composiciones antigénicas de la descripción.

Para los fines de esta descripción, la determinación de si un conjugado polisacárido neumocócico es significativamente más inmunogénico en composiciones que comprenden 3D-MPL en comparación con composiciones que comprenden 3D-MPL junto con un adyuvante con base de aluminio, debe establecerse como se describe en el Ejemplo 2. Como indicación de si una composición es significativamente más inmunogénica cuando comprende 3D-MPL solo, la proporción de la CMG de IgG (como se determina en el Ejemplo 2) entre composiciones que comprenden 3D-MPL solo frente a una composición equivalente que comprende 3D-MPL junto con adyuvante de fosfato de aluminio debe ser superior a 2, preferentemente superior a 5, más preferentemente superior a 7, todavía más preferentemente superior a 9 y más preferentemente superior a 14.

Entre los problemas asociados con el enfoque polisacárido de la vacunación se encuentra el hecho de que los polisacáridos *per se* son malos inmunógenos. Entre las estrategias que se han diseñado para superar esta falta de

ES 2 300 255 T3

inmunogenicidad se incluyen la unión (conjugación) del polisacárido a portadores proteicos grandes, que proporcionan ayuda de células T inespecíficas. Ejemplos de dichos portadores que se pueden usar incluyen los toxoides de difteria, mutante de difteria, y del tétanos (TD, CRM197 y TT, respectivamente), la hemocianina de lapa californiana (KLH), el derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD) y OMPC de *Neisseria meningitidis*.

La proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento EP 0 594 610-B), o fragmentos de la misma (véase la sección C), se usa como portador proteico inmunogénico para los polisacáridos neumocócicos de la invención.

En una forma de realización, la composición antigénica de la descripción comprende el serotipo 4 del polisacárido neumocócico (PS) conjugado con una proteína inmunogénica y formulado con adyuvante 3D-MPL, donde la composición está sustancialmente desprovista de adyuvante con base de aluminio. En otras formas de realización, la composición antigénica comprende PS 6B, 18C, 19F o 23F, respectivamente, conjugado con una proteína inmunogénica y formulado con adyuvante 3D-MPL, donde la composición está sustancialmente desprovista de adyuvante con base de aluminio.

En otra forma más de realización de la descripción, se proporciona una combinación de composición antigénica que comprende dos o más conjugados polisacáridos neumocócicos del grupo PS 4, PS 6B, PS 18C, PS 19F y PS 23F, formulados con adyuvante 3D-MPL, donde la composición está sustancialmente desprovista de adyuvante con base de aluminio.

La inmunogenicidad de los conjugados polisacáridos neumocócicos de la descripción no está significativamente afectada por la combinación con otros conjugados polisacáridos neumocócicos (Ejemplo 3). En consecuencia, un aspecto preferido de la descripción proporciona una combinación de composición antigénica que comprende uno o más conjugados polisacáridos neumocócicos de la descripción en combinación con uno o más conjugados polisacáridos neumocócicos, donde la composición está formulada con adyuvante 3D-MPL, pero está sustancialmente desprovista de adyuvante con base de aluminio.

En otras formas más de realización preferidas de la descripción se proporcionan composiciones antigénicas de combinación que contienen al menos uno, y preferentemente 2, 3, 4 o los 5 conjugados polisacáridos neumocócicos PS 4, 6B, 18C, 19F o 23F, y, además, cualquier combinación de otros conjugados polisacáridos neumocócicos, que se formulan con un adyuvante 3D-MPL pero sustancialmente desprovistas de adyuvante con base de aluminio.

Normalmente, la combinación de composición antigénica de *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá antígenos conjugados polisacáridos, en la que los polisacáridos derivan de al menos cuatro, siete, once, trece, quince o veintitrés serotipos (véase "Antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de la invención", anteriormente sobre las combinaciones preferidas de serotipos en función de la enfermedad que se va a tratar).

Las composiciones antigénicas de la invención se usan, preferentemente, como composiciones de vacunas para prevenir (o tratar) las infecciones neumocócicas, en particular en ancianos y lactantes y niños pequeños.

Otras formas de realización de la presente invención incluyen: la condición de las anteriores composiciones antigénicas para usar en medicina; y el uso de una de las anteriores composiciones antigénicas en la fabricación de un medicamento para la prevención (o tratamiento) de la enfermedad neumocócica.

Para la prevención/mejora de la neumonía en la población de ancianos (+ 55 años) y de la otitis media en lactantes (hasta 18 meses de edad) y niños pequeños (normalmente de 18 meses a 5 años), otra forma de realización preferida es combinar un conjugado polisacárido multivalente de *Streptococcus pneumoniae* formulado como se ha descrito en la presente memoria descriptiva con una proteína de *Streptococcus pneumoniae*, o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma. Véase la sección anterior "Proteínas neumocócicas" sobre combinaciones preferidas de proteínas/proteína.

Preferentemente, las composiciones antigénicas (y vacunas) descritas antes en la presente memoria descriptiva, están liofilizadas hasta que están a punto de usarse, punto en el cual se reconstituyen de forma extemporánea con diluyente. Más preferentemente se liofilizan en presencia de 3D-MPL y se reconstituyen de forma extemporánea con solución salina.

La liofilización de las composiciones tiene como resultado una composición más estable (por ejemplo previene la degradación de los antígenos polisacáridos). Sorprendentemente, el procedimiento es también responsable de un título de anticuerpos todavía más elevado contra los polisacáridos neumocócicos. Se ha demostrado que esto es particularmente significativo para los conjugados con PS 6B. Por tanto, otro aspecto de la descripción es una composición antigénica liofilizada que comprende un conjugado de PS 6B adyuvado con 3D-MPL y sustancialmente desprovisto de adyuvantes con base de aluminio.

Para la preparación de las vacunas, véase la sección anterior "Preparaciones de vacunas de la invención".

C) *Conjugados de polisacárido bacteriano-proteína D*

La tendencia hacia las vacunas de combinación posee la ventaja de reducir las molestias para el receptor, lo que facilita la programación y garantiza la finalización del régimen; pero también existe el riesgo concomitante de reducir la eficacia de la vacuna (véase anteriormente la discusión sobre la supresión del epítipo a través del sobreuso de proteínas portadoras). Por tanto, sería ventajoso fabricar combinaciones de vacunas que satisfagan las necesidades de una población y que, además, no exhiban interferencias inmunogénicas entre sus componentes. Estas ventajas se pueden llevar a cabo mediante las composiciones inmunogénicas (o vacunas) de la invención, que son de un beneficio particular para la administración de vacunas de combinación a grupos de alto riesgo, tales como lactantes, niños pequeños o ancianos.

La presente invención proporciona una proteína D de *Haemophilus influenzae*, o fragmentos de la misma, como portador de una composición inmunogénica basada en polisacáridos, incluidas las vacunas. Fragmentos adecuados para usar incluyen fragmentos que abarquen epítopos de células T colaboradoras. En particular, el fragmento de proteína D contendrá preferentemente el 1/3 del extremo N de la proteína.

La proteína D es una proteína de unión a la IgD de *Haemophilus influenzae* (documento EP 0 594 610 B1) y es un potencial inmunógeno.

Entre los polisacáridos que se van a conjugar con la proteína D contemplada por la presente invención se incluyen, entre otros, el antígeno polisacárido Vi contra *Salmonella typhi*, los polisacáridos meningocócicos (incluidos los tipos A, C, W135 e Y, y el polisacárido y los polisacáridos modificados del meningococo del grupo B), polisacáridos de *Staphylococcus aureus*, polisacáridos de *Streptococcus agalactiae*, polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, polisacáridos de micobacterias, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* (tal como manofosfoinosítidos trehalosas, ácido micólico, arabinomananos con manosa terminales, la cápsula del mismo y arabinogalactanos), polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, los lipopolisacáridos de *Haemophilus influenzae* no tipificable, el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae b*, los lipopolisacáridos de *Moraxella catarrhalis*, los lipopolisacáridos de *Shigella sonnei*, el lipopéptidofosfogluano (LPPG) de *Trypanosoma cruzi*, los gangliósidos asociados con cáncer GD3, GD2, las mucinas asociadas con tumores, especialmente el antígeno T-F, y el antígeno sialil T-F y el polisacárido asociado con el VIH estructuralmente relacionado con el antígeno T-F.

El polisacárido puede estar unido a la proteína portadora por cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, por Likhite, patente de EE.UU. 4.372.945 y por Armor y col., patente de EE.UU. 4.474.757). Preferentemente se lleva a cabo la conjugación con CDAP (documento WO 95/08348).

En CDAP, preferentemente se usa el reactivo cianilante tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridinio (CDAP) para la síntesis de conjugados de polisacárido-proteína. La reacción de cianilación se puede realizar en condiciones relativamente suaves, que evita la hidrólisis de los polisacáridos sensibles alcalinos. Esta síntesis permite el acoplamiento directo a una proteína portadora.

El polisacárido se solubiliza en agua o una solución salina. El CDAP se disuelve en acetonitrilo y se añade inmediatamente a una solución de polisacáridos. El CDAP reacciona con los grupos hidroxilo del polisacárido para formar un éster cianato. Tras la etapa de activación se añade la proteína portadora. Los grupos amino de la lisina reaccionan con el polisacárido activado para formar un enlace covalente isousea.

Tras la reacción de acoplamiento se añade un gran exceso de glicina para inactivar las funciones activadas residuales. A continuación el producto se pasa a través de permeación en gel para eliminar la proteína portadora que no ha reaccionado y los reactivos residuales. En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento de producir conjugados de proteína D y polisacárido, que comprende las etapas de activar el polisacárido y unir el polisacárido con la proteína D.

En una forma de realización preferida de la invención se proporciona una formulación de composición inmunogénica (o vacuna) para la prevención de infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae*.

Los mecanismos por los cuales los neumococos se extienden a los pulmones, el líquido cefalorraquídeo y la sangre no están bien entendidos. El crecimiento de las bacterias que alcanzan los alveolos pulmonares normales se inhibe por su relativa sequedad y por la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares. Cualquier cambio anatómico o fisiológico de estas defensas coordinadas tienden a aumentar la susceptibilidad de los pulmones a la infección. La pared celular de *Streptococcus pneumoniae* tiene un papel importante en la generación de una respuesta inflamatoria en los alveolos de los pulmones (Gillespie y col., (1997), I&I 65: 3936).

Normalmente, la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá conjugados de proteína D y polisacárido, en los que el polisacárido deriva de al menos cuatro, siete, once, trece, quince o 23 serotipos. Véase anteriormente "Antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de la invención" sobre las combinaciones preferidas de serotipos dependiendo de la enfermedad que se va a tratar.

En otra forma de realización de la invención se proporciona una vacuna de *Neisseria meningitidis*; en particular, de los serotipos A, B, C, W135 e Y. *Neisseria meningitidis* es una de las causas más importantes de la meningitis

bacteriana. La cápsula de carbohidrato de estos organismos puede actuar como determinante de la virulencia y una diana para un anticuerpo protector. No obstante, se sabe bien que los carbohidratos son malos inmunógenos en niños pequeños. La presente invención proporciona una proteína portadora particularmente adecuada para estos polisacáridos, la proteína D, que proporciona epítomos de células T que pueden activar una respuesta de células T para ayudar a la proliferación y maduración de las células B específicas del antígeno polisacárido, así como la inducción de una memoria inmunológica.

En una forma de realización alternativa de la invención se proporciona un conjugado de polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae b* (PRP)-proteína D.

La presente invención también contempla vacunas de combinación que proporcionan protección contra una gama de diferentes patógenos. Sorprendentemente, una proteína D portadora es útil como portador en vacunas de combinación en las que se conjugan múltiples antígenos polisacáridos. Como se ha mencionado antes, es probable que la supresión de epítomo se produzca si se usa el mismo portador para cada polisacárido. El documento WO 98/51339 presentó composiciones para intentar minimizar esta interferencia mediante la conjugación de una proporción de los polisacáridos en la composición en el TD y el resto en el TT.

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que la proteína D es particularmente adecuada para minimizar tales efectos de supresión de epítomo en las vacunas de combinación. Uno o más polisacáridos en una combinación pueden conjugarse de forma ventajosa en la proteína D, y preferentemente todos los antígenos están conjugados en la proteína D dentro de tales vacunas de combinación.

Una combinación preferida incluye una vacuna que confiere protección contra la infección por *Neisseria meningitidis* C e Y (y preferentemente A), en la que el antígeno polisacárido de uno o más serotipos Y y C (y más preferentemente A) están unidos a la proteína D.

La vacuna basada en el polisacárido de *Haemophilus influenzae* (PRP conjugado con, preferentemente, TT, TD o CRM197, o más preferentemente con la proteína D) puede formularse con las vacunas de combinación anteriores.

En la actualidad, muchas vacunas pediátricas se administran en forma de una vacuna de combinación de modo que se reduzca el número de inyecciones que un niño tiene que recibir. Por tanto, para las vacunas pediátricas se pueden formular otros antígenos con las vacunas de la invención. Por ejemplo, las vacunas de la invención se pueden formular, o administrar por separado pero al mismo tiempo, con la bien conocida vacuna de combinación "trivalente" que comprende el toxoide diftérico (TD), el toxoide del tétanos (TT) y los componentes de pertussis [normalmente toxoide de *Pertussis* destoxificado (TP) y hemaglutinina filamentosa (FHA) con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinina 1+2], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPaTM (SmithKlineBeecham Biologicals), que contiene antígenos TD, TT, TP, FHA y PRN, o con un componente pertussis de célula entera, por ejemplo el comercializado por SmithKlineBeecham Biologicals como TritanrixTM. La vacuna combinada puede también comprender otro antígeno, tal como el antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg), los antígenos del virus de la polio (por ejemplo, el virus de la polio trivalente inactivado-VPI), proteínas de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis*, proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificable, proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis*.

Ejemplos de antígenos proteicos preferidos de *Moraxella catarrhalis* que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [documento WO 97/41731 (Antex) y documento WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y TbpB [documento WO 97/13785 y documento WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61: 2003-2010]; UspA1/2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; y OmpCD. Ejemplos de antígenos no tipificables de *Haemophilus influenzae* que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen; proteína fimbriada [(documento US 5766608- Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de los mismos [p. ej., LB1(f) fusiones de péptidos; documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York)]; TbpA y TbpB; Hia; Hmw 1,2; Hap; y D15.

Vacunas pediátricas preferidas contempladas por la presente invención son:

- a) Conjugado polisacárido de *N. meningitidis* C y conjugado polisacárido de *Haemophilus influenzae b*, opcionalmente con el conjugado polisacárido de *N. meningitidis* A y/o Y, siempre que todos los polisacáridos estén conjugados con la proteína D.
- b) Vacuna a) con TD, TT, componentes de pertussis (preferible TP, FHA y PRN), antígeno de superficie de la hepatitis B y VPI (vacuna de poliovirus trivalente inactivado)
- c) Antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con la proteína D.
- d) Vacuna c) con uno o más antígenos de *Moraxella catarrhalis* y/o *Haemophilus influenzae* no tipificable.

ES 2 300 255 T3

Todas las vacunas de combinación anteriores se pueden beneficiar de la inclusión de la proteína D como portador. Claramente, cuantos más portadores implicados en una vacuna de combinación (por ejemplo para superar una supresión de epítipo), más cara y compleja es la vacuna final. Por tanto, tener todos, o la mayoría, de los antígenos polisacáridos de una vacuna de combinación conjugados a la proteína D proporciona una ventaja considerable.

Para la prevención de la neumonía en la población de ancianos (+ 55 años) y de la otitis media en lactantes o niños pequeños, es una forma de realización preferida de la invención combinar antígenos polisacáridos multivalentes de *Streptococcus pneumoniae*-proteína D como se ha descrito en la presente memoria descriptiva con una proteína de *Streptococcus pneumoniae*, o un equivalente inmunológicamente funcional del mismo. Véase la sección anterior “Proteínas neumocócicas de la invención” sobre las combinaciones preferidas proteínas/proteína que se pueden incluir en tal combinación.

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína D y un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae*.

Preferentemente, los antígenos conjugados polisacárido-proteína D de la presente invención están adyuvados en la formulación de vacuna de la invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivados, o polifosfazenos.

Para las vacunas para ancianos se prefiere que el adyuvante se seleccione de modo que sea un inductor preferencial de un tipo Th1 de respuesta.

Para los adyuvantes Th1 concretos véase “Adyuvantes Th1 de la invención”, en lo que antecede.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un inmunógeno o vacuna como se ha descrito en la presente memoria descriptiva para usar en medicina.

Para la preparación/administración de vacunas del conjugado, véase “Preparación de vacuna de la invención”, en lo que antecede.

La proteína D también se usa de forma ventajosa en una vacuna contra la otitis media, ya que en sí misma es un inmunógeno capaz de producir protección mediada por células B contra *Haemophilus influenzae* no tipificable (ntHi). El ntHi puede invadir las células huésped y evadir los efectos mediados por las células B inducidos por el antígeno proteico. Los presentes inventores han encontrado, sorprendentemente, un modo de incrementar la eficacia de la proteína D (bien pos sí sola o como portadora para un polisacárido) como antígeno para una vacuna contra la otitis media. Esto se realiza mediante la adyuvación de la proteína D de modo que se induce una fuerte respuesta Th1 en el sujeto de modo que se optimiza contra la proteína D la rama del sistema inmunitaria mediada por células. Esto sorprendentemente se consigue usando una composición liofilizada que comprende la proteína D y un adyuvante Th1 (preferentemente 3D-MPL), que se reconstituye poco antes de la administración. Por tanto, la invención también proporciona tales composiciones, un procedimiento para fabricar tales composiciones (mediante liofilización de una mezcla que comprende la proteína D y un adyuvante Th1) y un uso de tal composición en el tratamiento de la otitis media.

En un sentido más amplio, los inventores establecen que liofilizar un inmunógeno en presencia de un adyuvante Th1 (véase “Adyuvantes Th1 de la invención”), preferentemente 3D-MPL, aumentará generalmente la respuesta inmunitaria Th1 contra el inmunógeno. Por tanto, la presente invención es aplicable a cualquier inmunógeno para el que se requiera una respuesta inmunitaria Th1 más fuerte. Tales inmunógenos comprenden antígenos bacterianos, virales y de proteínas tumorales, así como proteínas y péptidos propios.

Ejemplos

Los ejemplos ilustran pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Polisacárido capsular de S. pneumoniae

La vacuna candidata 11-valente incluye los polisacáridos capsulares de serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, preparados esencialmente como se describe en el documento EP 72513. Cada polisacárido se activa y deriva usando química de CDAP (Documento 95/08348) y se conjuga a la proteína portadora. Todos los polisacáridos están conjugados en su forma nativa, a excepción del serotipo 3 (cuyo tamaño se redujo para disminuir su viscosidad).

ES 2 300 255 T3

Portador proteico

El portador proteico seleccionado en la proteína D recombinante (PD) de *Haemophilus influenzae* no tipificable, expresado en *E. coli*:

Expresión de la proteína D

Proteína D de Haemophilus influenzae

Construcción genética para la expresión de proteína D

Materiales de partida

El ADN que codifica la proteína D

La proteína D está altamente conservada entre todos los serotipos de *H. influenzae* y las cepas no tipificables. El vector pHIC348 que contiene la secuencia de ADN que codifica la totalidad del gen de la proteína D se ha obtenido del Dr. A. Forsgren, Departamento de Microbiología Médica, Universidad de Lund, Malmö, Suecia. Janson y col. (1991) *Infect. Immun.* 59: 119-125 han publicado la secuencia de ADN de la proteína D.

El vector de expresión pMG1

El vector de expresión pMG1 es un derivado de pBR322 (Gross y col., 1985) en el que se introdujeron elementos de control derivados del bacteriófago λ para la transcripción y traducción de genes extraños insertados (Shatzman y col., 1983). Además, se intercambiaron el gen de resistencia a ampicilina por el gen de resistencia a kanamicina.

La cepa AR58 de E. coli

La cepa AR58 de *E. coli* se generó mediante transducción de N99 con una reserva del fago P1 previamente cultivado en un derivado SA500 (galE::TN10, λ dakil⁻ci857 Δ H1). N99 y SA500 son cepas K12 de *E. coli* derivadas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de Salud.

El vector de expresión pMG1

Para la producción de proteína D, se ha clonado el ADN codificador de la proteína en el vector de expresión pMG 1. Este plásmido usa señales del ADN del fago lambda para dirigir la transcripción y la traducción de los genes extraños insertados. El vector contiene el promotor PL, el operador OL y dos puntos de utilización (NutL y NutR) para romper los efectos de polaridad transcripcional cuando se proporciona la proteína N (Gross y col., 1985). Los vectores que contienen el promotor PL se introducen en un huésped lisogénico *E. coli* para estabilizar el ADN plasmídico. Las cepas del huésped lisogénico contienen ADN del fago lambda con replicación defectuosa integrado en el genoma (Shatzman y col., 1983). El ADN cromosómico del fago lambda dirige la síntesis de la proteína represora cl que se une al represor de OL del vector y previene la unión de la ARN polimerasa al promotor OL y, por tanto, la transcripción del gen insertado. El gen cl de la cepa de expresión AR58 contiene un mutante sensible a la temperatura de modo que la transcripción dirigida por PL puede regularse mediante cambios de temperatura, es decir un incremento en la temperatura del cultivo inactiva el represor y se inicia la síntesis de la proteína extraña. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas extrañas, especialmente de aquéllas que pueden ser tóxicas para la célula (Shikamata y Rosenberg, 1981).

La cepa AR58 de E. coli

La cepa lisogénica AR58 de *E. coli* usada para la producción de la proteína D portadora es un derivado de la cepa estándar de *E. coli* del NIH K12 N99 (F⁻su⁻galK2, lacZ⁻thr⁺⁺). Contiene un fago lambda lisogénico defectivo (galE::TN10, λ dakil⁻ci857 Δ H1). El fenotipo Kil⁻ previene el cierre de la síntesis de macromoléculas del huésped. La mutación ci857 confiere una lesión sensible a la temperatura al represor cl. La delección Δ H1 elimina el operón derecho del fago lambda y los loci bio, uvr3 y chlA de los huéspedes. La cepa AR58 se generó mediante transducción de N99 con la reserva del fago P1 previamente cultivada en un derivado de SA500 (galE::TN10, λ dakil⁻ci857 Δ H1). La introducción del lisogen defectivo en N99 se seleccionó con tetraciclina en virtud de la presencia de un transposón TN10 codificador de la resistencia a tetraciclina en el gen GalE adyacente.

Construcción del vector pMGMDPPrD

El vector pMG 1 que contiene el gen codificador de la proteína no estructural S1 del virus Influenzae (pMGNSI) se usó para construir pMGMDPPrD. El gen de la proteína D se amplificó mediante PCR a partir del vector pHIC348 (Janson y col., 1991) con cebadores de PCR que contiene los sitios de restricción NcoI y XbaI en los extremos 5' y 3', respectivamente. A continuación, el fragmento NcoI/XbaI se introdujo en pMGNSI entre NcoI y XbaI, lo que crea una proteína de fusión que contiene los 81 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 seguidos de la proteína D. Este vector se llamó pMGNS I PrD.

ES 2 300 255 T3

Basándose en el constructo descrito antes se generó el constructo final para la expresión de la proteína D. Un fragmento BamHI/BamHI se eliminó del pMGNS1PrD. Esta hidrólisis de ADN elimina la región codificadora NS1, a excepción de los primeros tres residuos N-terminales. Una vez que el vector se ha vuelto a unir se ha generado un gen codificador de una proteína de fusión con la siguiente secuencia de aminoácidos en el extremo N:

5 ---MDP SSHSSNMANT----

NS1 Proteína D

10 La proteína D no contiene un péptido líder o la cisteína en el extremo N a la que las cadenas lipídicas normalmente están unidas. Por tanto, la proteína no se excreta en el periplasma ni está lipídica y permanece en el citoplasma en forma soluble.

15 El constructo final pMG-MPPrD se introdujo en la cepa huésped AR58 mediante shock térmico a 37°C. Las bacterias que contienen el plásmido se seleccionaron en presencia de kanamicina. La presencia del inserto de ADN codificador de la proteína D se demostró mediante la digestión de ADN plasmídico aislado con endonucleasas seleccionadas. La cepa recombinante de *E. coli* se denomina ECD4.

20 La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor P_L /Operador O_L de lambda. La cepa huésped AR58 contiene un gen *cl* sensible a la temperatura en el genoma que bloquea la expresión del P_L de lambda a una temperatura baja mediante la unión a O_L . Una vez que la temperatura está elevada se libera *cl* del O_L y se expresa la proteína D. Al final de la fermentación, las células se concentran y congelan.

25 La extracción desde las células recolectadas y la purificación de la proteína D se realizó del siguiente modo. El precipitado del cultivo de las células congeladas se descongela y resuspende en una solución de rotura celular (tampón citrato pH 6,0) hasta una DO_{650} final= 60. La suspensión se pasa dos veces a través de un homogeneizador de presión a $P= 1000.10^3$ Pascales. El homogeneizado del cultivo celular se aclara mediante centrifugación y los residuos celulares se eliminan mediante filtración. En la primera etapa de purificación, el lisado filtrado se aplica a una columna de cromatografía de intercambio de cationes (SP Sepharose Fast Flow™). La PD se une a la matriz de gel mediante interacción iónica y se eluye mediante un incremento escalonado de la fuerza iónica del tampón de elución.

En una segunda etapa de purificación se retienen las impurezas en una matriz de intercambio aniónico (Q Sepharose Fast Flow™). La PD no se une al gel y se puede recolectar en el flujo continuo.

35 En ambas etapas de la cromatografía en columna la recolección de la fracción se monitoriza mediante DO. El flujo continuo de la cromatografía de columna de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra mediante ultrafiltración.

40 La proteína D que contiene el producto retenido mediante ultrafiltración se pasa por último a través de una membrana de 0,2 μ m.

Química

Activación y química de acoplamiento

45 Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas para cada polisacárido. Estas se indican en la Tabla 1. El polisacárido nativo (a excepción de PS3) se disolvió en NaCl 2M o en agua para inyectable. La concentración óptima del polisacárido se evaluó para todos los serotipos.

50 De una solución madre 100 mg/ml en acetonitrilo, a la solución del polisacárido se añadió CDAP (proporción de CDAP/PS de 0,75 mg/mg de PS). 1,5 minutos más tarde se añadió trietilamina 0,2M para obtener el pH de activación específico. La activación del polisacárido se realizó a este pH durante 2 minutos a 25°C. La proteína D (la cantidad depende de la proporción PS/PD inicial) se añadió al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento se llevó a cabo al pH específico durante 1 hora. A continuación la reacción se inactivó con glicina durante 30 minutos a 25°C y durante la noche a 4°C.

Los conjugados se purificaron mediante filtración en gel usando una columna de filtración en gel Sephacryl™ 500HR equilibrada con NaCl 0,2M.

60 Se determinó el contenido en carbohidrato y proteína de las fracciones eluidas. Los conjugados se acumularon y filtraron en esterilidad en una membrana de esterilización de 0,22 μ m. Se determinaron las proporciones de PS/Proteína en las preparaciones del conjugado.

Caracterización

65 Cada conjugado se caracterizó y cumplió las especificaciones descritas en la Tabla 2. El contenido en polisacárido (μ g/ml) se midió mediante la prueba de resorcinol y el contenido proteico (μ g/ml) mediante la prueba de Lowry. La proporción final de PS/PD (p/p) se determinó mediante la proporción de las concentraciones.

ES 2 300 255 T3

Contenido residual de DMAP (ngl μ g de PS)

La activación del polisacárido con CDAP introduce un grupo cianato en el polisacárido y se libera DMAP (4-dimetilamino-piridin). El contenido residual de DMAP se determinó mediante un ensayo específico desarrollado en SB.

Contenido de polisacárido libre (%)

El contenido de polisacárido libre de los conjugados mantenido a 4°C o almacenado 7 días a 37°C se determinó en el sobrenadante obtenido tras incubación con anticuerpos α -PD y sulfato amónico saturado, seguido por una centrifugación.

Para la cuantificación del polisacárido libre en el sobrenadante se usó un ELISA DE α -PS/ α -PS. La ausencia de conjugado también se controló mediante ELISA α -PD/ α -PS. La reducción de la cantidad de polisacárido libre tiene como resultado una mejora de la vacuna conjugada.

Antigenicidad

La antigenicidad en los mismos conjugados se analizó en un ELISA de tipo sándwich, en el que la captura y la detección de anticuerpos fueron α -PS y α -PD respectivamente.

Contenido de proteína libre (%)

El nivel de proteína D residual “libre” se determinó usando un procedimiento con tratamiento con SDS de la muestra. El conjugado se calentó 10 min a 100°C en presencia de SDS al 0,1% y se inyectó en una columna de filtración en gel SEC-HPLC (TSK 3000-PWXL). Dado que la proteína D es un dímero, existe un riesgo de sobreestimar el nivel de proteína D “libre” mediante disociación de la estructura con SDS.

Tamaño molecular (K_{av})

El tamaño molecular se midió en una columna de filtración en gel SEC-HPLC (TSK 5000-PWXL).

Estabilidad

La estabilidad se midió en una columna de filtración en gel SEC-HPLC (TSK 6000-PWXL) para los conjugados mantenidos a 4°C y almacenados durante 7 días a 37°C.

La caracterización 11-valente se indica en la Tabla 2.

Los conjugados proteicos se pueden adsorber en fosfato de aluminio y se agruparon para formar la vacuna final.

Conclusión

Se han producido conjugados inmunogénicos que se ha mostrado que son componentes de una prometedora vacuna. Se descubrieron las condiciones de CDAP optimizadas para la obtención del producto final de polisacárido neumocócico conjugado de la mejor calidad para cada una de las 11 valencias. Los conjugados de estos polisacáridos neumocócicos obtenibles mediante el procedimiento CDAP anterior mejorado (optimizado) (con independencia de la proteína portadora, pero preferentemente la proteína D) es, por tanto, otro aspecto de la invención.

Ejemplo 2

Estudio del efecto de adyuvantes avanzados sobre la inmunogenicidad de la vacuna conjugada neumocócica PS-PD 11-valente en ratas lactantes

Las ratas lactantes se inmunizaron con una vacuna neumocócica conjugada PS-PD 11-valente a una dosis de 0,1 μ g cada polisacárido (preparado de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1) y usando las formulaciones adyuvantes siguientes: ninguna, AIPO₄, 3D-MPL, 3D-MPL sobre AIPO₄.

La formulación con únicamente 3D-MPL fue estadísticamente (sorprendentemente) más inmunogénica (CMG de IgG mayor) que para las otras formulaciones para 5 de 11 antígenos. Esto fue cierto a concentraciones tanto altas como bajas de 3D-MPL.

La opsonofagocitosis confirmó los resultados de la CMG.

ES 2 300 255 T3

Materiales y Procedimientos

Protocolo de inmunización

5 Las ratas OF1 lactantes se aleatorizaron a diferentes madres y tenían 7 días cuando recibieron la primera inmunización. Recibieron 2 inmunizaciones adicionales 14 y 28 días después. El día 56 (28 días después de III) se realizó una extracción de sangre. Todas las vacunas se inyectaron s.c. y había 10 ratas por grupo de vacuna.

10 Las ratas se inmunizaron con una vacuna neumocócica conjugada 11-valente que comprende los siguientes serotipos de polisacáridos conjugados en la proteína D: 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F.

Formulación

15 Para examinar el efecto de diferentes adyuvantes avanzados, la dosis del conjugado se mantuvo constante a 0,1 μg de cada polisacárido y los adyuvantes AIPO₄ y 3D-MPL se formularon en dosis y combinaciones diferentes sin que incluyan adyuvante en absoluto. En la Tabla 3 se indican numéricamente para referencia.

Adsorción en AIPO₄

20 Se prepararon monovalentes adsorbidos concentrados de acuerdo con el procedimiento siguiente. Se mezclaron 50 μg de AIPO₄ (pH 5,1) con 5 μg de polisacáridos conjugados durante 2 horas. El pH se ajustó a pH 5,1 y la mezcla se dejó durante otras 16 horas. Se añadió NaCl 1500 mM para hacer la concentración de sales hasta 150 mM. Tras 5 minutos se añadieron 5 mg/ml de 2-fenoxietanol. Después de otros 30 minutos el pH se ajustó a 6,1 y se dejó durante más de 3 días a 4°C.

25

Preparación de diluyentes

Se prepararon tres diluyentes en NaCl 150 mM/5 mg/ml de fenoxietanol

30

A: AIPO₄ a 1 mg/ml

B: 3D-MPL en AIPO₄ a 250 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente, proporción en peso de 3D-MPL/AIPO₄= 5/20

C: 3D-MPL en AIPO₄ a 561 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente, proporción en peso de 3D-MPL/AIPO₄= 50/89

35

Preparación de undecavalente adsorbida

40 Los once monovalentes de PS-PD adsorbidos, concentrados se mezclaron a la proporción correcta. El complemento de AIPO₄ se añadió como diluyente A. Cuando fue necesario se añadió 3D-MPL bien como una solución acuosa (no adsorbida, Modo 1, véase más adelante) o como diluyente B o C (3D-MPL adsorbido en AIPO₄ a 2 dosis, Modo 2, véase más adelante).

Modo 1

45

A los conjugados adsorbidos combinados se añadió 3D-MPL como suspensión acuosa. Se mezcló con el undecavalente durante 10 minutos a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C hasta su administración.

Modo 2

50

3D-MPL se pre-adsorbió en AIPO₄ antes de la adición a los conjugados adsorbidos combinados (diluyente B y C). Para preparar 1 ml de diluyente, se mezcló una suspensión acuosa de 3D-MPL (250 o 561 μg) con 1 mg de AIPO₄ en NaCl 150 mM a pH 6,3 durante 5 min a temperatura ambiente. Esta solución se diluyó en NaCl pH 6,1/fenoxi y se incubó durante la noche a 4°C.

55

Preparación de undecavalente no adsorbida

Los once conjugados PS-PD se mezclaron y diluyeron a la correcta proporción en NaCl 150 mM a pH 6,1, fenoxi. Cuando se requirió se añadió 3D-MPL como solución (no adsorbida).

60

Las formulaciones para todas las inyecciones se prepararon 18 días antes de la primera administración.

ELISA

65

El ELISA se realizó para medir la IgG de rata usando el protocolo derivado del Taller de la OMS sobre el procedimiento ELISA para la cuantificación de los anticuerpos IgG contra los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* en suero humano. En esencia, el polisacárido capsular purificado reviste directamente la placa de microtitulación. Las muestras de suero se pre-incubaban con el polisacárido de pared celular común a todos los neumococos

ES 2 300 255 T3

(sustancia C) y que está presente en aproximadamente el 0.5% de los polisacáridos neumocócicos purificados de acuerdo con la descripción (documento EP 72513 B1). Para detectar la IgG murina unida se emplearon reactivos de Jackson ImmunoLaboratories Inc. Mediante ecuación logística log modelada las curvas de titulación se realizaron con referencia a patrones internos (anticuerpos monoclonales). Los cálculos se efectuaron usando software SoftMaz Pro. Se previó un error *absoluto* máximo en estos resultados del orden de un factor de 2. El error relativo es inferior al 30%.

Opsonofagocitosis

Los títulos opsonicos se determinaron para los serotipos 3, 6B, 7F, 14, 19F y 23F usando el protocolo del CDC (opsonofagocitosis de *Streptococcus pneumoniae* usando células HL60 diferenciadas, versión 1.1) con PMN humanos purificados y complemento de conejo lactante. La modificación incluyó el uso de cepas neumocócicas internas y las células HL60 fagocíticas se sustituyeron por neutrófilos PMN humanos purificados (existe un grado elevado de correlación entre estas células fagocíticas). Además, a los pocillos de microtitulación se añadieron esferas de vidrio de 3 mm para incrementar el mezclado, y esto permitió la reducción de la proporción fagocito:bacteria que se recomendó que fuera 400.

Resultados

Concentraciones de IgG

La media geométrica de las concentraciones de IgG para cada serotipo y la PD se muestran en las Tablas 4 a 10. Para los serotipos 6B, 14, 19F y 23F, se incluyen para comparación los resultados previos obtenidos usando una formulación tetravalente.

Las concentraciones más elevadas de IgG se han destacado en las Tablas 4 a 10. El valor estadístico p para las composiciones de 3D-MPL frente a las composiciones de 3D-MPL/AIPO₄ se indica en la Tabla 11. La formulación adyuvante número 4 (conjugados no adsorbidos con dosis elevada de 3D-MPL) da las CMG más elevadas para 9 de 11 casos. En 5/11 casos, la dosis baja de MPL es la segunda más inmunogénica. Además, la adyuvación da CMG más elevadas que mediante la modificación de la dosis para todos los serotipos (datos no mostrados), y esto es estadísticamente significativo para los serotipos 4, 6B, 7F, 18C y 23F ($p < 0,05$ del IC del 95%).

Opsonofagocitosis

Los resultados de la opsonofagocitosis en suero combinado para los serotipos 3, 6B, 7F, 14, 19F y 23F se muestran en las Tablas 4 a 8. En su mayor parte, estos títulos opsonicos confirman la CMG de IgG. De hecho, la correlación con la concentración de IgG es superior al 85% para los serotipos 6B, 19F, 23F (datos no mostrados). Para el serotipo 3 es importante destacar que sólo el grupo de 3D-MPL indujo actividad opsonica por encima del umbral.

Conclusiones

En este experimento, fue inesperado que el uso de 3D-MPL solo induciría las concentraciones más elevadas de IgG.

La CMG máxima de IGG obtenida con la modificación del adyuvante se comparó con la CMG máxima obtenida mediante la modificación de la dosis de PS y se descubrió que 3D-MPL podría inducir respuestas significativamente más elevadas en 5/11 serotipos.

La Tabla 11 muestra que cuando se comparan las composiciones de 3D-MPL y 3D-MPL/AIOP₄ (comparando el procedimiento de la formulación y la dosis de 3D-MPL), 5 de los conjugados polisacáridos mejoran significativamente, en términos de inmunogenicidad, cuando se formulan con sólo 3D-MPL en lugar de 3D-MPL más AIPO₄: PS 4, PS 6B, PS 18C, PS 19F y PS 23F.

Ejemplo 3

Estudio del efecto de la combinación sobre la inmunogenicidad de los conjugados PS 4, PS 6B, PS 18C, PS 19F y PS 23F en ratas adultas

Ratas adultas se inmunizaron con vacunas conjugadas de polisacárido neumocócico-proteína D, bien individualmente o bien combinados en una composición multivalente (bien tetra-, penta-, hepta- o decavalente). Grupos de 10 ratas se inmunizaron dos veces con una separación de 28 días y se obtuvieron análisis de sangre el día 28 y el día 42 (14 días después de la 2ª dosis).

Los sueros se analizaron mediante ELISA para detectar anticuerpos IGG frente a los polisacáridos neumocócicos. Todos los conjugados indujeron anticuerpos IgG específicos, medidos mediante ELISA. La tabla 12 muestra el efecto de la combinación de conjugados monovalentes PS 6B, PS 18C, PS 19F Y PS 23F con proteína D sobre su inmunogenicidad en ratas adultas, medido mediante la concentración de IgG a los 14 días de la 2ª dosis.

ES 2 300 255 T3

Se realizó un análisis estadístico en todas las muestras para determinar si las diferencias en la concentración del anticuerpo tras la combinación eran significativas. La combinación de cualquiera de los serotipos PS 6B, PS 18C, PS 19F y PS 23F conjugados con proteína D en una vacuna multivalente no cambió de forma significativa su inmunogenicidad.

5

TABLA 1

*Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados PS *S. pneumoniae*-Proteína D*

10

Serotipo	1	3 (μ líq.)	4	5	6B	7F
Conc. de PS (mg/ml)	2,0	3,0	2,0	7,5	5,4	3,0
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc. de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporción inicial de PS/PD (p/p)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Conc. CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a = pH _c = pH _q	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0

15

20

25

30

35

40

Serotipo	9V	14	18C	19F	23F
Conc. de PS (mg/ml)	2,5	2,5	2,0	4,0	3,3
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc. de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporción inicial de PS/PD (p/p)	1/0,75	1/0,75	1/1	1/0,5	1/1
Conc. CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a = pH _c =	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	10/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0

45

50

55

60

65

ES 2 300 255 T3

pH _q					
-----------------	--	--	--	--	--

5

TABLA 2

Especificaciones de la vacuna neumocócica undecavalente PS-PD (los primeros números del código del lote indican el serotipo)

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Criterios	D01PDJ 227	D03PDJ 236	D4PDJ 228	D5PDJ 235	D6PDJ 209	
Proporción PS/Prot (p/p)	1/0,66	1/1,09	1/0,86	1/0,86	1/0,69	
Contenido (%) de polisacárido libre < 10%	1	1	7	9	0	
Contenido (%) sin proteína < 15%	8	<1	19	21	9	
Contenido DMAP (ng/μg PS) < 0,5	0,2	0,6	0,4	1,2	0,3	
ng/μg PS						
Tamaño molecular (K_{av})						
Estabilidad						
	0,18	0,13	0,12	0,11	0,13	

ES 2 300 255 T3

	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Cambio bajo	Sin cambios	
	D07PDJ 225	D09PDJ 222	D14PDJ 202	D18PDJ 221	D19PDJ 206	D23PDJ 212
Proporción PS/Prot (p/p)	1/0,58	1/0,80	1/0,68	1/0,62	1/0,45	1/0,74
Contenido (%) de polisacárido libre < 10%	1	<1	<1	4	4	0
Contenido (%) sin proteína < 15%	8	0,3	3	21	10	12
Contenido DMAP (ng/μg PS) < 0,5 ng/μg PS	0,1	0,6	0,3	0,2	0,1	0,9
Tamaño molecular (K _{av})						
Estabilidad	0,14	0,14	0,17	0,10	0,12	0,12
	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Cambios	Sin cambios

ES 2 300 255 T3

TABLA 3

Tabla resumen de formulaciones adyuvantes analizadas con PS-PD neumocócica undecavalente en ratas lactantes

Grupo	AIPO4	MPL	Procedimiento	Descripción
1				Ninguna
2	100			AIPO4
3		5		MPL bajo
4		50		MPL alto
5	100	5	Modo 1	Modo 1 bajo
6	100	50	Modo 1	Modo 1 alto
7	100	5	Modo 2	Modo 2 bajo
8	100	50	Modo 2	Modo 2 alto

Tabla 4. Concentración media geométrica de IGG en el serotipo 6B, seroconversión y título opsonico medio el día 28 después inmunización III de ratas lactantes con PS-PD undecavalente usando diferentes adyuvantes (y comparación con la inmunización tetravalente)

Grupo	AIPO4 µg	MPL µg	Procedimiento	CMG de IGG en 6B (µg/ml)		Seroconv 6B		Título opsonico de 6B*	
				Tetravalente	Undecavalente	2/10	4/10	12,5	65
1				0,047	0,047	2/10	1/10	12,5	<6,25
2	100			0,048	0,019	4/10	4/10	65	<6,25
3		5			1,345		10/10		43
4		50			4,927		10/10		192
5	100	5	1		0,042		7/10		<6,25
6	100	50	1		0,255		10/10		<6,25
7	100	5	2	0,033	0,048	3/10	8/10	<6,25	<6,25
8	100	50	2		0,057		8/10		<6,25

Tabla 5. Concentración media geométrica de IGG en el serotipo 14, seroconversión y título opsónico medio el día 28 después inmunización III de ratas lactantes con PS-PD undecavalente usando diferentes adyuvantes (y comparación con la inmunización tetravalente)

Grupo	AIPO4	MPL	Procedimiento	Tetravalente		Undecavalente		Título opsónico de 14*
				CMG de IGG en 14 (µg/ml)	Seroconv en 14	CMG de IGG en 14 (µg/ml)	Seroconv en 14	
1				0,046	3/10	0,022	3/10	<6,25
2	100			0,99	10/10	0,237	8/10	27
3		5				0,233	10/10	41
4		50				0,676	10/10	81
5	100	5	1			0,460	9/10	67
6	100	50	1			0,477	10/10	98
7	100	5	2	0,81	10/10	0,165	8/10	81
8	100	50	2			1,611	10/10	133

Tabla 6. Concentración media geométrica de IGG en el serotipo 19F, seroconversión y título opsónico medio el día 28 después de inmunización III de ratas lactantes con PS-PD undecavalente usando diferentes adyuvantes (y comparación con la inmunización tetravalente)

Grupo	AIPO4 µg	MPL µg	Procedimiento	Tetravalente		Undecavalente		Seroconv 19F	Título opsónico de 19F*	CMG de IGG en 19F (µg/ml)	Seroconv en 19F	Título opsónico de 19F*
				CMG de IGG en 19F (µg/ml)	Título opsónico de 19F*	CMG de IGG en 19F (µg/ml)	Título opsónico de 19F*					
1				0,04	64	0,021	2/10	2/10	<6,25			
2	100			1,07	367	0,222	9/10	7/10	79			
3		5				4,028		10/10	296			
4		50				21,411		10/10	1276			
5	100	5	1			1,649		10/10	172			
6	100	50	1			2,818		10/10	208			
7	100	5	2	1,09	193	0,766	10/10	10/10	323			
8	100	50	2			3,539		10/10	241			

Tabla 7. Concentración media geométrica de IGG en el serotipo 19F, seroconversión y título opsonico medio el día 28 después inmunización III de ratas lactantes con PS-PD undecavalente usando diferentes adyuvantes (y comparación con la inmunización tetravalente)

Grupo	AIPO4 µg	MPL µg	Procedimiento	Tetravalente		Undecavalente		Título opsonico de 23F*
				CMG de IGG 23F (µg/ml)	Seroconversión de 23F	CMG de IGG 23F (µg/ml)	Seroconversión de 23F	
1				0,06	2/10	0,152	3/10	<6,25
2	100			0,29	10/10	0,56	8/10	<6,25
3		5				2,296	9/10	389
4		50				4,969	10/10	>1600
5	100	5	1			0,462	5/10	17
6	100	50	1			0,635	8/10	54
7	100	5	2	0,38	10/10	0,203	3/10	18
8	100	50	2			0,501	7/10	43

Tabla 8. Concentración media geométrica de IGG en los serotipos 3 y 7F, seroconversión y título opsónico medio el día 28 después de inmunización III de ratas lactantes con PS-PD undecavalente usando diferentes adyuvantes

Grupo	AIPO4 µg	MPL µg	Procedimiento	3 CMG de IGG (µg/ml)	3 Seroconv ersión	3 Título opsónico *	7F CMG de IGG (µg/ml)	7F Seroconv ersión	7F Título opsónico*
1				0,003	1/10	<6,25	0,040	7/10	<6,25
2	100			0,008	6/10	<6,25	0,25	9/10	43
3		5		0,070	10/10	<6,25	2,435	10/10	477
4		50		0,108	10/10	18-	2,569	10/10	332
5	100	5	1	0,015	10/10	<6,25	0,579	10/10	54
6	100	50	1	0,027	10/10	<6,25	0,611	9/10	59
7	100	5	2	0,006	10/10	<6,25	0,154	8/10	30
8	100	50	2	0,034	10/10	<6,25	0,638	9/10	140

Tabla 9. Concentración media geométrica de IGG en los serotipos 1, 4 y 5, seroconversión y título opsónico medio el día 28 después inmunización III de ratas lactantes con PS-PD undecavalente usando diferentes adyuvantes

Grupo	AIPO4 µg	MPL µg	Procedimiento	1 CMG de IGG (µg/ml)	1 Seroconv ersión	4 CMG de IGG (µg/ml)	4 Seroconv ersión	5 CMG de IGG (µg/ml)	5 Seroconv ersión
1				0,026	4/10	0,005	0/10	0,040	3/10
2	100			0,282	8/10	0,052	5/10	0,774	9/10
3		5		1,614	10/10	3,452	10/10	7,927	10/10
4		50		2,261	10/10	7,102	10/10	13,974	10/10
5	100	5	1	0,568	10/10	0,676	10/10	3,015	10/10
6	100	50	1	1,430	10/10	0,419	9/10	5,755	10/10
7	100	5	2	0,478	10/10	0,267	9/10	2,062	10/10
8	100	50	2	1,458	10/10	0,423	10/10	5,009	10/10

Tabla 10. Concentración media geométrica de IGG en los serotipos 9V, 18C y PD, seroconversión y título opsonico medio el día 28 después inmunización III de ratas lactantes con PS-PD undecavalente usando diferentes adyuvantes

Grupo	AIPO4 µg	MPL µg	Procedimiento	9V CMG de IGG (µg/ml)	9V Seroconv ersión	18C CMG de IGG (µg/ml)	18C Seroconv ersión	PD CMG de IGG (µg/ml)	PD Seroconv ersión
1				0,018	0/10	0,013	1/10	0,003	0/10
2	100			0,489	6/10	0,092	5/10	0,993	10/10
3		5		0,482	7/10	6,560	10/10	3,349	10/10
4		50		11,421	10/10	14,023	10/10	5,446	10/10
5	100	5	1	2,133	9/10	0,690	10/10	11,407	10/10
6	100	50	1	2,558	10/10	1,771	10/10	1,258	10/10
7	100	5	2	1,536	10/10	0,528	10/10	1,665	8/10
8	100	50	2	2,448	9/10	0,980	10/10	5,665	10/10

ES 2 300 255 T3

TABLA 11

La significación estadística (valor p) de si ciertos conjugados polisacáridos neumocócicos habían mejorado la inmunogenicidad cuando se formula con 3D-MPL solo frente a 3D-MPL/AIPO₄. Un valor p inferior a 0,01 se considera altamente significativo. El modo 1 y el Modo 2 indican el procedimiento de formulación

Serotipo	50 µg de 3D-MPL frente a 3D-MPL/AIPO ₄		50 µg de 3D-MPL frente a 3D-MPL/AIPO ₄	
	Modo 1	Modo 2	Modo 1	Modo 2
1	0,3	0,05	0,079	0,11
3	0,075	0,01	0,27	0,008
4	0,002	0,0003	0,02	0,003
5	0,04	0,002	0,1	0,12
6B	0,001	0,0001	0,001	0,0006
7F	0,13	0,15	0,01	0,005
9V	0,02	0,02	0,1	0,04
14	0,65	0,21	0,3	0,66
18C	0,0008	0,0002	0,006	0,004
19F	0,0009	0,006	0,21	0,04
23F	0,002	0,0004	0,01	0,0004

TABLA 12

Concentración media geométrica de IgG (µg/ml) el día 14 después de la 2ª dosis tras la inmunización III de ratas adultas con 1,0 µg de conjugado polisacárido-proteína D solo o combinado en una vacuna tetravalente, pentavalente, heptavalente o decavalente. Estos datos se combinan de 5 experimentos distintos

Serotipos	4	6B	18C	19F	23F
Vacunas	H	T	H	T	T
Solos	9,3	0,11	15	5,2	2,5
Combinados	4	0,23	3,7	3,7	2,8

T: Combinado en tetravalente (T) (PS 6B, 14, 19F, 23F), pentavalente (T más PS 3), heptavalente (H) (T más PS 4, 9V y 18C) y decavalente (H más PS 1, 5 Y 7F), vacunas combinadas. H: combinado en heptavalente (H) (T más PS 4, 9V y 18C) y decavalente (H más PS 1, 5 y 7F), vacunas combinadas.

Ejemplo 4

Impacto beneficioso de la adición de neumolisina y 3D-MPL sobre la eficacia protectora de la vacuna undecavalente conjugada con PD contra la colonización neumocócica de los pulmones en ratones

Lecturas inmunológicas

Dosis de ELISA de IgG sérica específica de neumolisina

Inmunoplasmas Nunc Maxisorp™ se recubrieron durante 2 horas a 37°C con 100 µl/pocillo de 2 µg/ml de neumolisina nativa recombinante (PLY) diluida en PBS. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de NaCl al 0,9% Tween-20 al 0,05%. A continuación, diluciones seriadas al doble (en PBS/Tween-20™ 0,05%, 100 µl por pocillo) de una referencia sérica de anti-PLY añadidas como curva estándar (comenzando a 670 ng/ml de IgG) y muestras de suero (comenzando

ES 2 300 255 T3

a una dilución 1/10) se incubaron durante 30 minutos a 20°C en agitación. Tras lavar como se ha descrito anteriormente, se incubó IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa (Jackson) diluida 5000 veces en PBS/Tween-20 al 0,05% (100 µl/pocillo) durante 30 minutos a 20°C en agitación. Después de lavar, las placas se lavaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de tampón de revelado (OPDA 0,4 mg/ml y H₂O₂ al 0,05% en tampón citrato 100 mM a pH 4,5). El revelado se detuvo añadiendo 50 µl/pocillo de HCl 1N. Las densidades ópticas se leyeron a 490 y 620 nm usando el inmunolector Emax (Molecular Devices). El título de anticuerpos se calculó mediante el método matemático de 4 parámetros usando el software SoftMax.

Inhibición de la hemólisis

Este ensayo se realizó para medir la capacidad de los anticuerpos séricos para inhibir la actividad hemolítica de la neumolisina (PLY). Con el fin de eliminar el colesterol (susceptible de interactuar con PLY), las muestras de suero se trataron 2 veces del siguiente modo: se mezclaron con un volumen igual de cloroformo y después se incubaron durante 45 minutos en agitación. Los sobrenadantes se recogieron tras la centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm. Los sueros sin colesterol se diluyeron (diluciones seriadas 1:2 en ditiotreititol 1 mM, BSA al 0,01%, TRIS 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) en microplacas de 96 pocillos (Nunc). A cada pocillo se añadieron cincuenta µl de una solución que contiene 4 HU (Unidad de hemólisis) de PLY y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 100 µl de glóbulos rojos de oveja (solución del 1%) durante 30 minutos a 37°C. Tras la centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm, los sobrenadantes se recogieron (150 µl) y se colocaron en otra microplaca de 96 pocillos para la lectura de la densidad óptica a 405 nm. Los resultados se expresaron en forma de títulos de dilución en el punto medio.

Destoxificación química de la neumolisina

La neumolisina nativa recombinante (PLY) se dializó contra tampón fosfato 50 mM NaCl 500 mM a pH 7,6. Las etapas siguientes se realizaron a 39,5°C en agitación episódica. El día 1 se añadieron Tween-80 10% (1/250 v/v), N-acetiltriptófano 57,4 mM a pH 7,6 (3/100 v/v), glicina 2,2M en tampón fosfato (1/100 v/v) y formaldehído al 10% en tampón fosfato (3/100 v/v) en la solución de PLY. Los días 2 y 3 se añadió formaldehído al 10% de nuevo a una proporción de 3/100 y 2/100 v/v respectivamente. La incubación a 39,5°C se mantuvo hasta el día 7 en agitación episódica. Por último, la PLY se dializó contra tampón fosfato 50 mM NaCl 500 mM a pH 7,6. La inactivación completa de PLY se demostró en el ensayo de hemólisis.

Provocación intranasal neumocócica en ratones OF1

En ratones hembra OF1 de siete semanas de edad se inoculó intranasalmente con anestesia 5.10⁵ UFC de *S. pneumoniae* de serotipo 6B adaptado para ratones. A las 6 horas de la provocación se extrajeron los pulmones y se homogeneizaron (Ultramax, 24000 rpm, 4°C) en medio Todd Hewith Broth (THB, Gibco). Diluciones seriadas 1:10 de los homogeneizados de pulmón se sembraron en placas durante la noche a 37°C en placas Petri que contenían agar THB suplementado con extracto de levadura. La infección pulmonar neumocócica se determinó como el número de UFC/ratón, expresado en forma de media logarítmica ponderada. El límite de detección fue 2,14 log UFC/ratón.

Ejemplo 4A

Efecto del adyuvante 3D-MPL sobre la respuesta inmunitaria anti-neumolisina

En el presente ejemplo evaluamos el impacto de la adyuvación con 3D-MPL sobre la respuesta inmunitaria a la neumolisina nativa recombinante (PLY, proporcionada por J. Paton, Children's Hospital, North Adelaide, Australia) y su homólogo químicamente destoxificado (DPLY). La destoxificación química se realizó tal y como se ha descrito antes.

Grupos de 10 ratones hembra Balb/c de 6 semanas de edad se inmunizaron por vía intramuscular los días 0, 14 y 21 con 1 µg de PLY o DPLY contenida en A: 100 µg de AIPO₄; o B: 100 µg de AIPO₄ + 5 µg de 3D-MPL (lípidos A 3-des-O-acilado monofosforilo, suministrado por Ribic Immunochem). Las Figuras 1A y 1B muestran la IgG en ELISA y los títulos de inhibición de hemólisis (IHL) medidos en sueros tras III.

Cualquiera que fuera el antígeno, las mejores respuestas inmunitarias se indujeron en animales vacunados con formulaciones suplementadas con 3D-MPL. Es interesante el hecho de que DPLY fue tan inmunogénica como PLY cuando se administró con AIPO₄ + 3D-MPL, mientras que era un inmunógeno más débil en la formulación de AIPO₄. Esto mostró la ventajosa capacidad de 3D-MPL para mejorar la respuesta de anticuerpos a la neumolisina destoxificada.

En composiciones que contienen neumolisina, puede ser preferible usar neumolisina químicamente destoxificada en lugar de la neumolisina destoxificada mutacionalmente. Esto es porque las mutantes destoxificadas obtenidas hasta la fecha todavía tienen actividad de toxina residual, la neumolisina químicamente destoxificada no tiene. Por tanto, se considera otro aspecto de la invención que, en general, las composiciones que comprenden neumolisina (o mutantes de neumolisina) que ha sido químicamente destoxificada para usar en una vacuna, deberán adyuvarse con un adyuvante Th1, preferentemente 3D-MPL. La invención proporciona dichas composiciones. También se establece un procedimiento de incremento de la respuesta inmunitaria de la neumolisina químicamente destoxificada dentro de una

ES 2 300 255 T3

composición inmunógena, que comprende las etapas de añadir a la composición un adyuvante Th1 (preferentemente 3D-MPL).

Ejemplo 4B

5

Impacto beneficioso de la adición de un mutante atenuado de neumolisina y adyuvante 3D-MPL sobre la eficacia protectora de la vacuna polisacárido undecavalente conjugada con PD contra la colonización pulmonar neumocócica en ratones OF1 en los que se ha realizado una provocación intranasal con el serotipo 6B

10 En el presente ejemplo los inventores han evaluado la eficacia profiláctica de una vacuna que contiene el conjugado undecavalente polisacárido-proteína D, antígeno atenuado de neumolisina mutante (PdB, documento Wo 90/06951) y adyuvantes AIPO4 + 3D-MPL, comparada con la clásica formulación de conjugado undecavalente polisacárido-proteína D adsorbida en AIPO4.

15 Grupos de 12 ratones hembra OF1 de 4 semanas de edad se inmunizaron por vía subcutánea los días 0 y 14 con formulaciones que contenían A: 50 μ g de AIPO4; B: 0,1 μ g de PS/serotipo de vacuna undecavalente de polisacárido conjugada con PD + 50 μ g de AIPO4 o C: 0,1 μ g de PS/serotipo de vacuna undecavalente de polisacárido conjugado con PD + 10 μ g de PdB (proporcionado por J. Paton, Children's Hospital, North Adelaide, Australia) + 50 μ g de AIPO4 + 5 μ g de 3D-MPL (suministrado por Rib Immunochem). La provocación se realizó el día 21 tal como se ha descrito antes.

20 Como se muestra en la Figura 1C, la vacuna conjugada polisacárida undecavalente se suplementó con PdB y se adyuvó con AIPO4 + MPL (las barras negras representan la media aritmética). Por el contrario, no se observó una protección significativa en animales inmunizados con la formulación de conjugado polisacárido undecavalente/AIPO4. Este resultado probó que la adición de antígeno neumolisina (incluso atenuado) y adyuvante 3D-MPL potenció la eficacia de la vacuna conjugada polisacárida undecavalente contra la neumonía.

Ejemplo 4C

30 *Correlación inmunitaria de la protección mostrada en el ejemplo 4B*

Con el fin de establecer la correlación inmunitaria de la protección conferida en el ejemplo 4B por la vacuna conjugada polisacárida undecavalente suplementada con neumolisina mutante atenuada (PDB) y 3D-MPL se midieron las respuestas serológicas de anticuerpos pre-provocación al polisacárido 6B y PdB tal y como se ha descrito antes.

35 A continuación se compararon los títulos de anticuerpos con el número de colonias bacterianas medidas en los pulmones de los animales correspondientes recolectados a las 6 horas de la provocación. Las R^2 se calcularon en regresiones lineales log/log.

40 Las R^2 calculadas fueron igual a 0,18 y 0,02 para las respuestas de anticuerpos anti-PdD y anti-6B, respectivamente. Esto mostró la ausencia de correlación entre las respuestas inmunitarias humorales y la protección frente a ambos antígenos. Los títulos de anticuerpos anti-6B no fueron significativamente diferentes en los grupos inmunizados con la vacuna conjugada undecavalente (GMT= 0,318 ng/ml) o con la misma vacuna suplementada con PdD y 3D-MPL (GMT= 0,458 ng/ml). Por tanto, la mejora en la protección observada con la formulación C no se debía exclusivamente a una respuesta de anticuerpos más elevada al polisacárido 6B.

45 En conjunto, los resultados sugieren que la protección no estaba mediada por las respuestas inmunitarias humorales solo, sino también por una inmunidad mediada por células inducida por el antígeno PdB en presencia de 3D-MPL. Esto dio soporte adicional a la adición de antígeno(s) proteico(s) y potente(s) adyuvante(s) en la vacuna conjugada polisacárida neumocócica, de modo que se coordinan ambas ramas del sistema inmunitario para una protección óptima.

Ejemplo 5

55 *La cooperación de ambas ramas del sistema inmunitario en ratones inmunizados de forma activa con neumolisina e inmunizados de forma pasiva con anticuerpos contra PS neumocócica*

Ejemplo 5A

60 *Descubrir la concentración de anticuerpo anti polisacárido de 6B (anti-PS) administrado de forma pasiva protector contra la neumonía*

Procedimiento

65 Grupos de vacuna: cuatro grupos de 16 ratones se inmunizaron de forma pasiva (i.p.) el día -1 con 100 μ l de antisuero antipolisacárido de rata no diluido de acuerdo con los grupos que se detallan a continuación. (un total de 64 ratones)

ES 2 300 255 T3

Grupo	Especificidad	Concentración de IgG en los antisueros
G1	α -PS-6B	5 μ g/ml
G2	α -PS-6B	5 μ g/ml
G3	α -PS-6B	0,75 μ g/ml
G4	Control	0 μ g/ml

Animales: 64 ratones macho CD-1 de Charles River, Canadá, de un peso aprox. de 35 g (de aproximadamente 10 semanas de edad).

Anestesia: Los ratones se anestesiaron con isoflurano (3%) más O₂ (1 l/min).

Organismo: *S. pneumoniae* N1387 (serotipo 6) se recogió de placas de agar soja tripticasa (TSA) suplementado con 5% de sangre de caballo y suspendido en 6 ml de PBS. Inmediatamente antes de la infección, 1 ml de suspensión bacteriana se diluyó en 9 ml de agar nutritivo fundido enfriado (BBL) y se mantuvo a 41°C. Los ratones recibieron aproximadamente 6,0 log₁₀ UFC/ratón en un volumen de 50 μ l.

Infección: El día 0, los ratones se anestesiaron como se ha descrito antes y se les infectó con *S. pneumoniae* N1387 (50 μ l de suspensión bacteriana enfriada) mediante instilación intrabronquial a través de intubación intratraqueal no quirúrgica. Este procedimiento fue descrito por Woodnut y Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43: 29 (1999)).

Muestras: El día 3 tras la infección 8 ratones/grupo fueron sacrificados mediante sobredosis de CO₂ y los pulmones se extirparon y homogeneizaron en 1 ml de PBS. Se prepararon diluciones seriadas 1:10 en PBS para enumerar el número de bacterias viables. Las muestras se inocularon (20 μ l) por triplicado en placas con TSA suplementado con 5% de sangre de caballo y se incubaron durante la noche a 37°C antes de la evaluación. Otros grupos de ratones se sacrificaron el día 7 y se tomaron muestras como se ha indicado antes.

Resultados

Conc. IgG (μ l/ml) en suero de rata	Número de bacterias (log 10 ufc/pulmones) a los días de la infección	
	3	8
5	6,7 \pm 0,7 (1/7)	7,2 \pm 0,7 (5/8)
2	6,5 \pm 0,7 (1/7)	6,9 \pm 1,8 (4/7)
0,75	7,7 \pm 0,5 (5/8)	4,8 \pm 1,4 (2/8)
0	6,7 \pm 1,5 (3/6)	6,3 \pm 1,5 (3/9)

Las cifras entre paréntesis son el número de animales que murieron antes del momento de la obtención de la muestra.

Conclusión: En general, no se observó una diferencia significativa en el número de bacterias aisladas de ninguno de los grupos de tratamiento. Esto indica que el anti-polisacárido no proporcionó protección cuantificable a concentraciones de hasta, e incluida, 5 μ g/ml.

Esto es similar a lo observado en algunos estudios clínicos humanos, es decir, los anticuerpos anti-polisacárido son insuficientes para proteger contra la neumonía neumocócica en algunas poblaciones.

ES 2 300 255 T3

Ejemplo 5B

Determinar la protección frente a la neumonía conferida por la administración activa de Ply (neumolisina) con o sin adyuvante, y la sinergia con anticuerpos subóptimos anti-PS

Procedimiento

Animales: 128 ratones macho CD-1 (6 semanas de edad en el momento de la inmunización, 10 semanas de edad en el momento de la infección) de Charles River, St. Constant, Québec, Canadá. Los animales pesaron aprox. 20 g a las 6 semanas y 38 g a las 10 semanas.

Inmunizaciones: Seis grupos de 16 ratones se inmunizaron mediante inyección subcutánea los días -22 y -14 con 100 μ l de vacuna, tal como se detalla más adelante. (un total de 128 ratones). PdB (documento WO 90/06951) se obtuvo por cortesía del Dr. James Paton, Australia. El 3D-MPL se obtuvo de Ribic/Corixa.

El día -1, se inmunizaron (i.p. 100 μ l) grupos específicos (véase la Tabla siguiente) de forma pasiva con una concentración de 4,26 μ g/ml (4 ml de 5 μ g/ml + 1,3 ml de 2 μ g/ml) de anticuerpos anti-polisacárido de ratón.

Grupo	Volumen de inyección activa	Vacuna administrada los días -22, -14 (dosis en μ g)	Volumen de inyección pasiva	IgG pasiva (día -1)
1-1	100 μ l s.c.	PdB/AIPO4 (10/50)		Ninguna
1-2	100 μ l s.c.	PdB/MPL/AIPO4 (10/5/50)		Ninguna
1-3	100 μ l s.c.	PdB/AIPO4 (10/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-4	100 μ l s.c.	PdB/MPL/AIPO4 (10/5/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-5	100 μ l s.c.	MPL/AIPO4 (5/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-6	100 μ l s.c.	MPL/AIPO4 (5/50)		Ninguna

Infección: El día 0, los ratones se anestesiaron (isoflurano 3% más 1l/min de O₂). Los inóculos bacterianos se prepararon mediante la recolección del crecimiento de *S. pneumoniae* N1287 (serotipo 6) de las placas de agar soja tripticasa (TSA) suplementado con 5% de sangre de caballo y suspendido en 6 ml de PBS. Se preparó una dilución 1:10 (1 ml más 9 ml) en agar nutritivo fundido enfriado (mantenido a 41°C) inmediatamente antes de la infección. Los ratones se infectaron mediante instilación intrabronquial mediante intubación intratraqueal y recibieron aproximadamente 6,0 log₁₀ UFC/ratón en un volumen de 50 μ l. Este procedimiento fue descrito por Woodnut y Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43: 29 (1999)).

Muestras: A los 72 horas tras la infección, 8 ratones/grupo fueron sacrificados mediante sobredosis de CO₂ y los pulmones se extirparon y homogeneizaron en 1 ml de PBS. Se prepararon diluciones 1:10 en PBS para enumerar el número de bacterias viables. Las muestras se inocularon (20 μ l) por triplicado en placas con TSA suplementado con 5% de sangre de caballo y se incubaron durante la noche a 37°C antes de la evaluación. Otros grupos de ratones se sacrificaron a los 8 días de la infección y se tomaron muestras como se ha indicado antes.

ES 2 300 255 T3

Análisis de datos

La medida del resultado para la comparación del tratamiento fue el número de bacterias en los pulmones a los 3 y 7 días de la infección. Los resultados se presentan en forma de las medias del grupo con desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student, en la que un valor $P < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

72 h después de la infección

Los recuentos bacterianos del grupo 1-4 fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los del grupo 1-3.

Los recuentos bacterianos del grupo 1-4 fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los del grupo 1-5.

168 h después de la infección

El número de bacterias en todos los números fue aproximadamente 2 logs inferior a los 8 días que a los 3 días, lo que indica que la infección se estaba resolviendo.

Los recuentos bacterianos del grupo 1-2 fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los del grupo 1-5

Grupo	Día 3		Día 8	
	Log UFC/pulmón	Desviación estándar	Log UFC/pulmón	Desviación estándar
1-1	6,93	0,61	5,23	1,28
1-2	6,59	1,25	4,08	1,34
1-3	7,09	0,8	5,32	1,26
1-4	6,09	1,43	4,46	2,32
1-5	7,19	0,89	5,42	1,05
1-6	6,68	1,14	5,01	1,48

Como se ha demostrado antes, los anticuerpos anti-polisacárido solos (grupo 1-5) no confieren protección contra el crecimiento de neumococos en los pulmones. PdB adyuvado con AIPO4 tampoco confiere protección, pero al día 8 existe una tendencia a la protección cuando PdB se combina con 3D-MPL (grupo 1-2).

Al día 3, el grupo protegido más significativamente, grupo 1-4, tenía los tres elementos, PdB, 3D-MPL y anticuerpos anti-polisacárido administrados pasivamente. Esta conclusión está respaldada por el índice de mortalidad. El Grupo 1-4 sólo tuvo 2/8 muertes en comparación con los 5/10 para los grupos 1-5 y 1-3.

Conclusión

Dado que el experimento se realizó con animales inmunizados pasivamente, el efecto sinérgico de inmunizar también activamente con neumolisina y MPL no puede deberse a un incremento en el nivel de los anticuerpos contra el antígeno polisacárido.

Dado que los animales sólo se inmunizaron pasivamente contra el polisacárido neumocócico, el día 8 los niveles de tal anticuerpo se habrían disipado en gran medida del huésped.

Incluso así, se puede observar una protección significativa contra la neumonía neumocócica en los grupos inmunizados con neumolisina más 3D-MPL y especialmente en los grupos inmunizados con neumolisina más 3D-MPL más anticuerpo anti-polisacárido administrado pasivamente, lo que indica la sinergia de esta combinación.

Si la inmunización con anti-polisacárido se había llevado a cabo de forma activa (preferentemente con polisacárido conjugado), el efecto habría sido todavía más marcado, ya que el efecto de memoria de las células B y los niveles constantes de anticuerpos anti-PS habrían contribuido a la cooperación de la respuesta inmunitaria (véase, por ejemplo, la Fig. 1C, en la que se mostró que muchos de los animales inmunizados de forma activa con polisacárido y proteína no tenían bacterias en los pulmones tras la provocación).

Ejemplo 6

Inmunogenicidad en ratones Balb/C de 1 año de edad de vacuna undecavalente conjugada con polisacárido neumocócico y proteína D adyuvada con 3D-MPL

Introducción y objetivo(s)

La protección frente a la infección neumocócica está mediada por anticuerpos específicos de serotipo mediante opsonofagocitosis. Puede conjeturarse que incrementos en la concentración de anticuerpos tendrán como resultado una mayor protección y, por tanto, se han realizado muchos esfuerzos para encontrar modos de incrementar la respuesta humoral. Una estrategia que se ha aplicado con éxito para conjugar las vacunas en los estudios pre-clínicos es el uso de adyuvantes inmunoestimulantes (revisado en Poolman y col., 1998, Carbohydrate-based Bacterial Vaccines. En: Handbook of Experimental Pharmacology eds. P. Perlmann y H. Wigsell. Springer-Verlag, Heidelberg, D).

Los datos presentados en esta sección muestran los resultados del último experimento usando lotes clínicos en un protocolo diseñado para simular un estudio clínico.

Protocolo

Ratones balb/c de un año de edad fueron inmunizados con 1/10 de la dosis humana de vacuna conjugada con polisacárido neumocócico y proteína D o con vacuna polisacárida simple 23-valente. Las vacunas usadas fueron lotes clínicos de DSP009, DSP013 o DSP014 correspondientes a las dosis de 1 mcg de los serotipos 6B y 23F y 5 mcg de los serotipos restantes de la vacuna conjugada undecavalente, la dosis de 0,1 mcg de la vacuna conjugada undecavalente o la dosis de 0,1 mcg de la vacuna conjugada undecavalente adyuvada con 5 mcg de 3D-MPL, respectivamente. Todas las vacunas conjugadas undecavalente también se adyuvaron con 50 μ g de AlPO₄.

Grupos de 20 ratones fueron inmunizados intramuscularmente. Las inyecciones de los grupos indicados en la tabla siguiente se realizaron los días 0 y 21. La sangre para análisis se obtuvo el día 35 (14 días después de la segunda dosis).

TABLA

Programa de inmunización para ratones Balb/c de 1 año de edad inmunizados con lotes clínicos de vacuna conjugada con polisacárido neumocócico-proteína D

Grupo	Día 0 Dosis 1 de la vacuna	Día 21 Dosis 2 de la vacuna	Número de ratones
1	Pneumovax-23 2,5 mcg	Tampón	20
2a	Pn-PD	Tampón	20

ES 2 300 255 T3

		undecavalente 0,1 mcg		
5	2b	Pn-PD undecavalente 0,1 mcg	Pn-PD undecavalente 0,1 mcg	20
10	3a	Pn-PD undecavalente + MPL 0,1 mcg + 5 mcg	Tampón	20
15	3b	Pn-PO undecavalente + MPL 0,1 mcg + 5 mcg	Pn-PD undecavalente + MPL 0,1 mcg + 5 mcg	20
20	4a	Pn-PD undecavalente 1/0,5 mcg	Tampón	20
25	4b	Pn-PD undecavalente 1/0,5 mcg	Pn-PD undecavalente 1/0,5 mcg	20
30	Control	Tampón	Tampón	20
35				

Los sueros se analizaron mediante ELISA para detectar los anticuerpos IgG frente a los polisacáridos neumocócicos siguiendo el protocolo consenso de CDC/OMS, es decir tras la neutralización de los sueros con el polisacárido de la pared celular. El ELISA se calibró para dar concentraciones de anticuerpos en mcg/ml usando anticuerpos monoclonales IgG1 específicos de serotipo.

Los análisis estadísticos de las comparaciones se calcularon usando UNISTAT versión 5.0 beta. Se realizó un ANOVA mediante el procedimiento de Tukey-HSD en concentraciones IgG transformadas log. La comparación pareada de los índices de seroconversión se realizó usando la prueba exacta de Fisher.

Resultados

La CMG de la IgG y el intervalo de confianza del 95% contra los 11 serotipos y la proteína D inducidos 14 días después de la segunda inmunización (Dosis 2) se muestran en la tabla siguiente. Se muestran los índices de seroconversión en los que no se pudo calcular un intervalo de confianza del 95%.

El grupo 1 muestra el efecto de la inmunización con polisacáridos sencillos, que normalmente induce sólo IgM en animales. La mayoría de los niveles de IgG son inferiores al umbral de detección; no obstante, los ratones balb/c fueron capaces de sintetizar IgG frente a pocos polisacáridos neumocócicos, principalmente de los serotipos 3, 19F y 14.

La inmunización con vacunas conjugadas indujo anticuerpos IgG con elevados índices de seroconversión contra todos los serotipos a excepción del 23F.

Se observó una respuesta dependiente de la dosis (grupo 4 frente al grupo 2) únicamente para los serotipos 7F y 19F, pero estas observaciones no fueron estadísticamente significativas. Una mayor respuesta se observó tras dos dosis (grupos b frente a los grupos a) para los serotipos 3, 6B, 7F y 19F, y PD, y estas observaciones fueron estadísticamente significativas en muchos casos con las 3 formulaciones.

Más interesante es el efecto del 3D-MPL. Dos dosis de la vacuna formulada con 3D-MPL (grupo 3b) indujeron la CMG más elevada de IgG específica, y esto fue estadísticamente significativo para todos los serotipos a excepción del 23F, en cuyo caso presentó un índice de seroconversión significativamente superior ($p=0,02$ grupo 3b frente al 2b, prueba exacta de Fisher).

ES 2 300 255 T3

TABLA

Media geométrica [IgG] e intervalos de confianza del 95% de serotipos neumocócicos seleccionados y la proteína D en ratones Balb/c de 1 año de edad 14 días después de la inmunización II con la vacuna conjugada undecavalente de PS-PD

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Grupo	1	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Serotipo	MG [1 gG] μg/ml (IC 95%)						
3	0,24 (0,16- 0,6)	0,18 (0,11- 0,27)	0,84 (0,47- 1,5)	0,72 (0,51- 1,0)	4,84 (3,0- 7,9)	0,22 (0,14- 0,35)	0,95 (0,19- 1,8)
6B	0,02 0/20#	0,04 8/19	0,19 (0,09- 0,41)	0,14 (0,07- 0,27)	0,74 (0,29- 1,9)	0,09 (0,05- 0,16)	0,11 (0,05- 0,23)
7F	0,04 0/20#	0,07 (0,04- 0,12)	0,19 (0,10- 0,39)	0,15 (0,10- 0,22)	0,97 (0,49- 2,0)	0,09 (0,06- 0,14)	0,45 (0,20- 1,02)
14	0,15 3/20#	4,5 (2,5- 8,1)	6,2 (3,6- 10,5)	12,9 (7,8- 21,2)	13,6 (9,4- 19,7)	4,0 (2,0- 8,0)	6,9 (4,6- 10,6)
19F	1,2 (0,56- 2,6)	6,7 (3,6- 12,5)	12,1 (7,6- 19,3)	10,1 (5,5- 18,5)	58,5 (42-81)	5,9 (3,5- 9,9)	22,0 (16,0- 30,2)
23F	0,07 1/20#	0,08 3/20#	0,08 2/19#	0,07 2/20#	0,17 9/20#	0,06 1/18#	0,10 4/20#
PD*	0,25 1/20#	5,2 (3,3- 8,3)	11,9 (6,9- 20,7)	13,5 (9,5- 19,0)	98,0 (49,1- 195)	10,9 (6,4- 18,4)	38,7 (21,3- 70,3)

* En UE/ml; # índice de seroconversión, definido como 2 desviaciones estándar por encima de la media del control negativo. Consúltense la tabla anterior para las definiciones de grupo.

ES 2 300 255 T3

Conclusión

Los datos presentados en el presente documento demuestran que la adición de 3D-MPL a la vacuna conjugada undecavalente con polisacárido neumocócico y proteína D incrementó la respuesta inmunitaria en ratones balb/c ancianos frente a todos los serotipos analizados.

En la mayoría de los casos, dos dosis de vacunas indujeron concentraciones medias geométricas de IgG superiores a una dosis. Dado que esto no se observa usando la vacuna polisacárida simple, incluso en humanos, se considera una indicación de una respuesta inmunitaria dependiente de células T y la inducción de memoria inmunitaria.

Estos datos avalan el esquema de administración de una vacuna usando polisacáridos neumocócicos conjugados adyuvados con adyuvantes Th1 (preferentemente 3D-MPL), en el que se administran al menos dos dosis de la vacuna adyuvada., preferentemente con una separación de 1-12 semanas y más preferentemente con una separación de 3 semanas. Tal esquema de administración se considera otro aspecto de la invención.

Los ratones usados en el experimento fueron no respondedores a PS 23 (simple o conjugada). Es interesante el hecho de que, aunque los niveles de anticuerpos contra el polisacárido permanecieron bajos con independencia de la composición de vacuna usada, muchos más ratones respondieron a PS23 cuando se usó 3D-MPL como adyuvante (siendo la seroconversión significativamente mayor). Un uso de adyuvantes Th1, en particular 3D-MPL, en composiciones de vacuna que comprenden polisacáridos neumocócicos conjugados con el fin de aliviar la falta de respuesta a un polisacárido neumocócico en una vacuna es otro aspecto más de la invención. Un procedimiento de aliviar la falta de respuesta con la composición mencionada anteriormente usando el esquema de administración de dos dosis descrito antes es otro aspecto más.

Ejemplo 7

Conjugado de polisacárido C de Neisseria meningitidis-Proteína D (PSC-PD)

A: Expresión de la proteína D

Como en el Ejemplo 1.

B. Fabricación del polisacárido C

La fuente del polisacárido del grupo C es la cepa C11 de *N. meningitidis*. Esta se fermenta usando técnicas de fermentación clásica (documento EP 72513). Los polisacáridos en polvo seco usados en el procedimiento de conjugación son idénticos a Mencevax (SB Biologicals s.a.).

Se descongela una alícuota de la cepa C11 y 0,1 ml de la suspensión se frota en una placa petri con medio Hinton Mueller suplementado con dializado de extracto de levadura (10%, v/v) y se incubó durante de 23 a 25 horas a 36°C en un incubador de aire saturado con agua.

A continuación, el crecimiento en superficie se resuspende en medio de fermentación esterilizado y se inocula con esta suspensión en un frasco Roux que contiene medio de Mueller Hinton suplementado con dializado de extracto de levadura (10%, v/v) y esferas de vidrio estériles. Tras la incubación del frasco Roux durante 23 a 25 horas a 36°C en un incubador de aire saturado con agua, el crecimiento en superficie se resuspende en 10 ml de medio de fermentación estéril y de 0,2 a 0,3 ml de esta suspensión se inoculan en otros 12 frascos Roux con medio Mueller Hinton.

Tras la incubación durante de 23 a 25 horas a 36°C en un incubador de aire saturado con agua, el crecimiento en superficie se resuspende en 10 ml de medio de fermentación estéril. La suspensión bacteriana se combina en un matraz cónico.

A continuación, esta suspensión se transfiere asépticamente al fermentador usando jeringas estériles.

La fermentación de meningococos se realiza en fermentadores contenidos en una estancia limpia a presión reducida. Generalmente la fermentación se completa tras 10-12 horas, correspondiente a aproximadamente 10^{10} bacterias/ml (es decir, la fase estacionaria precoz) y se detecta mediante el incremento del pH.

En esta etapa, todo el caldo se inactiva con calor (12 min a 56°C) antes de la centrifugación. Antes y después de la inactivación se toma una muestra del caldo y se frota en placas petri con medio de Mueller Hinton.

C: Purificación de PS

El procedimiento de purificación es un procedimiento de múltiples etapas realizado en todo el caldo de fermentación. En la primera etapa de purificación, el cultivo inactivado se aclara mediante centrifugación y se recupera el sobrenadante.

ES 2 300 255 T3

LA purificación del polisacárido se basa en la precipitación con una sal de amonio cuaternario (bromuro de cetil-trimetilamonio/CTAB, CETAVLON R). CTAB forma complejos insolubles con polianiones tales como polisacáridos, ácido nucleico y proteínas, dependiendo de su pI. Siguiendo condiciones iónicas controladas se puede usar este procedimiento para precipitar las impurezas (conductividad baja) o polisacáridos (conductividad alta).

5 Los polisacáridos incluidos en el sobrenadante aclarado se precipitan usando una tierra de diatomeas (CELITE® 545) como matriz para evitar la formación de masa inerte insoluble durante las diferentes precipitaciones/purificaciones.

10 *Esquema de purificación para el polisacárido C de N. meningitidis*

Etapa 1: Fijación del complejo PSC-CTAB en CELITE® 545 y eliminación de los residuos celulares, ácidos nucleicos y proteínas mediante lavado con CTAB 0,05%.

15 Etapa 2: Elución de PS con EtOH 50%. Las primeras fracciones que son turbias y contienen impurezas y LPS se desechan. La presencia de PS en las fracciones siguientes se verifica mediante la prueba de floculación.

Etapa 3: Refinación del complejo PS-CTAB en CELITE® 545 y eliminación de los ácidos nucleicos y proteínas más pequeños mediante lavado con CTAB 0,05%.

20 Etapa 4: Elución de PS con EtOH 50%. Las primeras fracciones turbias se desechan. La presencia de PS en las fracciones siguientes se verifica mediante la prueba de floculación.

25 El eluato se filtra y se recoge el filtrado que contiene el polisacárido bruto. El polisacárido se precipita del filtrado mediante la adición de etanol hasta una concentración final de 80%. A continuación se recupera el polisacárido en forma de un polvo blanco, se seca al vacío y se almacena a -20°C.

D: *Conjugación de CDAP*

30 *Conjugación de PSC y PD*

Para la conjugación de PSC y PD, se prefirió la tecnología de conjugación CDAP a la clásica activación con CNBr y acoplamiento a la proteína portadora a través de un espaciador. Primero, el polisacárido se activa mediante cianilación con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP). El CDAP es un reactivo de cianilación hidrosoluble en el que se incrementa la electrofilicidad del grupo ciano sobre la de CNBr, lo que permite que se realice la reacción de cianilación en condiciones relativamente suaves. Tras la activación, el polisacárido se puede acoplar directamente a la proteína portadora a través de sus grupos amino sin introducir ninguna molécula espaciadora. Los grupos éster cianato que no han reaccionado se inactivan por medio de una extensa reacción con glicina. El número total de etapas implicadas en la preparación de vacunas conjugadas se reduce y, lo que es más importante, las moléculas espaciadoras potencialmente inmunogénicas no están presentes en el producto final.

45 La activación de polisacáridos con CDAP introduce un grupo cianato en los polisacáridos y se libera dimetilaminopiridina (DMAP). El grupo cianato reacciona con los grupos NH⁺ en la proteína durante el posterior procedimiento de acoplamiento y se convierte en carbamato.

Activación de PSV y acoplamiento PSC-PD

La activación y el acoplamiento se realizan a +25°C.

50 Se disuelven en WFI 120 mg de PS durante al menos 4 h.

Se añade la solución de CDAP (100 mg/ml recién preparado en acetonitrilo) para alcanzar una proporción de CDAP/PS (p/p) de 0,75.

55 Tras 1 minuto y medio, el pH se eleva hasta el pH de activación (pH 10) mediante la adición de trietilamina y se estabiliza hasta la adición de PD.

A los 3 min 30 segundos se añade NaCl hasta una concentración final de 2M.

60 A los 4 min se añade PD purificada hasta alcanzar una proporción de PD/PS de 1,5/1; el pH se ajusta de inmediato hasta el pH de acoplamiento (pH 10). La solución se deja 1h en regulación de pH.

Inactivación

65 A la mezcla de PS/PD/CDAP se añaden 6 ml de una solución de glicina 2M. El pH se ajusta hasta el pH de inactivación (pH 8,8). La solución se agita durante 30 min a la temperatura de trabajo, después durante la noche a +2-8°C con agitación lenta continua.

ES 2 300 255 T3

Purificación de PS-PD

Tras la filtración (5 μm), el conjugado PS-PD se purifica en un cuarto frío mediante cromatografía de permeación en gel en un gel S400HR SephacrylTM para eliminar las moléculas pequeñas (incluida DMAP) y la PD sin conjugar:
5 Elución- NaCl 150 mM a pH 6,5; Monitorización- UV 280 nm, pH y conductividad.

Sobre la base del diferente tamaño molecular de los componentes de la reacción, los conjugados PS-PD eluyen primero, seguidos por la PD libre y, por último, DMAP. Las fracciones que contienen el conjugado detectadas mediante DMAB (PS) y μBCA (proteína) se combinan. Las fracciones combinadas se filtran en esterilidad (0,2 μm).
10

E: Formulación de la vacuna conjugada adsorbida PSC-PD

Lavado de AIPO₄

15 Con el fin de optimizar la adsorción del conjugado PSC-PD en AIPO₄, el AIPO₄ se lava para reducir la concentración de PO₄³⁻:

- AIPO₄ se lava con NaCl 150 mM y se centrifuga (4 veces);
- 20 - El precipitado se resuspende después en NaCl 150 mM y después se filtra (100 μm); y
- El filtrado se esteriliza con calor

25 Este AIPO₄ lavado se denomina WAP (fosfato autoclavado lavado).

Procedimiento de la formulación

El conjugado PSC-PD a granel se adsorbe en AIPO₄ WAP antes de la formulación final del producto terminado. El AIPO₄ WAP se agitó con PSC-PD durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pH se ajustó hasta 5,1 y la mezcla
30 se agitó durante otras 18 horas a temperatura ambiente. A 150 mM se añadió la solución de NaCl y la mezcla se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A 5 mg/ml se añadió 2-fenoxietanol y la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se ajustó a pH 6,1.

Composición final/dosis

- 35 - PSC-PD: 10 μg de PS
- AIPO₄ WAP: 0,25 mg Al³⁺
- 40 - NaCl: 150 mM
- 2-fenoxietanol: 2,5 mg
- Agua para inyección: hasta 0,5 ml
- 45 - pH: 6,1

F: Información preclínica

Immunogenicidad del conjugado polisacárido en ratones

La inmunogenicidad del conjugado PSC-DP se ha evaluado en ratones Balb/c de 8 semanas de edad. El conjugado simple (no adsorbido) o el conjugado adsorbido en AIPO₄ se inyectó en forma de vacuna monovalente. Los anticuerpos anti-PSC inducidos se midieron mediante EILISA, mientras que los anticuerpos funcionales se analizaron usando la prueba bactericida, basándose ambos procedimientos en los protocolos de los CDC (Centros para el control y prevención de enfermedades, Atlanta, EE.UU.). Se presentan los resultados de dos experimentos diferentes realizados para evaluar la respuesta frente a la dosis y el efecto del adyuvante (AIPO₄).
55

Experimento de dosis-intervalo

En este experimento, el PSC-PD se inyectó dos veces (separados dos semanas) en ratones Balb/c. Se usaron cuatro dosis diferentes de conjugado formulados en AIPO₄: 0,1; 0,5; 2,5 y 9,6 $\mu\text{g}/\text{animal}$. Se extrajo sangre de los ratones (10/grupo) los días 14 (14 tras I), 28 (14 tras II) y 42 (28 tras II). Las concentraciones medias geométricas (CMG) de los anticuerpos específicos del polisacárido C medidas mediante ELISA se expresaron en μg de IgG/ml usando IGG purificada como referencia. Los anticuerpos bactericidas se midieron en sueros combinados y los títulos se expresaron en forma de la recíproca de la dilución capaz de matar el 50% de las bacterias, usando la cepa C11 de *N. meningitidis* en presencia de complemento de conejos lactantes.
65

ES 2 300 255 T3

La respuesta a la dosis obtenida muestra una meseta de la dosis de 2,5 μg . Los resultados indican que existe una buena respuesta de refuerzo entre el día 14 tras I y 14 tras II. Los niveles de anticuerpos a los 28 días tras II son al menos equivalentes a los observados a los 14 días tras II. Los títulos de anticuerpos bactericidas concuerdan con las concentraciones medidas en el ELISA y confirman la inmunogenicidad del conjugado PSC-PD.

5

Efecto del adyuvante

En este experimento se evaluó un lote del conjugado PSC-PD formulado en AIPO4, el conjugado simple (no adyuvado) se inyectó para comparación. En 10 ratones/grupo se realizaron inyecciones dos veces, separadas por dos semanas, por vía subcutánea, de 2 μg de conjugado. Se extrajo sangre de los ratones los días 14 (14 tras I), 28 (14 tras II) y 42 (28 tras II) y se realizó el ELISA y se midieron los títulos de anticuerpos funcionales (Sólo el día 14 tras II y 28 tras II para la prueba bactericida). La formulación de AIPO4 induce títulos de anticuerpos hasta 10 veces mayores en comparación con las formulaciones no adyuvadas.

10

Conclusiones

15

Se pueden extraer las siguientes conclusiones generales de los resultados de los experimentos descritos antes:

20

- El conjugado PSC-PD induce una respuesta anamnésica que demuestra que el PSC, cuando está conjugado, se convierte en un antígeno dependiente de células T.
- Las concentraciones de anticuerpos anti-PSC medidas mediante ELISA se correlacionan bien con los títulos de anticuerpos bactericidas que muestran que los anticuerpos inducidos por el conjugado PSC-PD son funcionales contra el serogrupo C de *N. meningitidis*.
- Parece que aproximadamente 2,5 μg del conjugado adsorbido en AIPO4 provoca una respuesta óptima de anticuerpos en ratones.
- La química del CDAP parece ser un procedimiento adecuado para fabricar conjugados PSC-PD inmunogénicos.

25

30

Ejemplo 8

Preparación de un conjugado de polisacárido de N. meningitidis del serogrupo A-PD

35

Un polvo seco de polisacárido A (PSA) se disolvió durante una hora en NaCl 0,2M hasta una concentración final de 8 mg/ml. A continuación el pH se fija hasta un valor de 6 con HCl o NaOH y la solución se termorregula a 25°C. A la solución de PSA se añaden 0,75 mg de CDAP/mg de PSA (una preparación a 100 mg/ml de acetonitrilo). Tras 1,5 minutos sin regulación de pH se añade NaOH 0,2M para obtener un pH de 10. 2,5 minutos después se añade proteína D (concentrada a 5 mg/ml) de acuerdo con una proporción de PD/PSA de aproximadamente 1. Durante el periodo de la reacción de acoplamiento de 1 hora se mantiene un pH de 10. Después se añaden 10 mg de glicina (2M pH 9,0)/mg de PSA y el pH se regula a un valor de 9,0 durante 30 minutos a 25°C. A continuación la mezcla se conserva durante la noche a 4°C antes de la purificación mediante cromatografía en columna de exclusión (Sephacryl S400HR de Pharmacia). El conjugado eluye primero, seguido por el PD sin reaccionar y los subproductos (DMAP, glicina, sales). El conjugado se recoge y esteriliza mediante filtración en 0,2 μm en una membrana Sartopore de Sartorius.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 300 255 T3

Ejemplo 9

Caracterización *in vitro* de los productos de los Ejemplos 7 y 8

5 Las principales características se resumen en el presente documento en la siguiente tabla:

Nº	Descripción del conjugado	Contenido proteico y de PS ($\mu\text{g/ml}$)	Proporción PS/proteína (p/p)	Proteína libre (%)	PS libre (%)
1	PS C-PD NaOH para la regulación del pH	PD:210 PS: 308	1/0,68	<2	8-9
2	PS C-PD TEA para la regulación del pH	PD:230 PS:351	1/0,65	<2	5-6
3	PS A-PD NaOH para la regulación del pH	PD:159 PS:149	1/1,07	5	5-9

Resultados *in vitro*

Como modelo animal se usaron ratones Balb/C para analizar la inmunogenicidad de los conjugados. Los conjugados se adsorbieron en IPO_4 o Al(OH)_3 ($10 \mu\text{g}$ de PS en $500 \mu\text{g}$ de Al^{3+}) o no se adsorbieron. Los ratones recibieron inyecciones del siguiente modo: 2 inyecciones a intervalos de dos semanas ($2 \mu\text{g}$ de PS/inyección).

De estos resultados podemos concluir, primero que el PS libre influye considerablemente sobre la respuesta inmunitaria. Se han obtenido resultados mejores con los conjugados que tienen menos del 10% de PS libre. Las mejoras anteriores del procedimiento CDAP es, por tanto, otro aspecto de la invención.

La formulación es asimismo importante. Parece que el AlPO_4 es el adyuvante más adecuado en este modelo. Los conjugados inducen un efecto de refuerzo que no se observa cuando los polisacáridos se inyectan solos.

Conclusiones

Los conjugados de *N. meningitidis* A y C se obtuvieron con una proporción final de PS/proteína de 1 y 0,6-0,7 (p/p), respectivamente. El PS libre y la proteína portadora libre fueron inferiores al 10% y 15%, respectivamente. La recuperación del polisacárido es superior al 70%. Los conjugados de PSA y PSC obtenibles mediante el anterior procedimiento con CDAP mejorado (optimizado) (con independencia de la proteína portadora, pero preferentemente la proteína D) son, por tanto, otro aspecto de la invención.

ES 2 300 255 T3

Ejemplo 10

Preparación de un conjugado de polisacárido de H. influenzae b-PD

5 *H. influenzae* b es una de las principales causas de la meningitis en niños menores de 2 años de edad. El polisacárido capsular de *H. influenzae* (PRP) como conjugado en el toxoide del tétanos es bien conocido (conjugado mediante química desarrollada por J. Robbins). El CDAP es una química mejorada. Los datos siguientes representan condiciones de CDAP óptimas encontradas para conjugar el PRP, preferentemente con PD.

10 Los parámetros que influyen sobre la reacción de conjugación son los siguientes:

- La concentración inicial del polisacárido (que puede tener un impacto doble sobre los niveles finales del polisacárido libre y sobre la etapa de filtración estéril).
- 15 • La concentración inicial de la proteína portadora.
- La proporción inicial entre el polisacárido y la proteína (que también puede tener un doble impacto sobre los niveles finales del polisacárido libre y sobre la etapa de filtración estéril).
- 20 • La cantidad de CDAP usada (normalmente en gran exceso)
- La temperatura de la reacción (que puede influir sobre la degradación del polisacárido, la cinética de la reacción y la degradación de los grupos reactivos).
- 25 • El pH de la activación y el acoplamiento.
- El pH de la inactivación (que influye sobre el nivel de DMAP residual).
- El tiempo de activación, acoplamiento e inactivación.

30 Los presentes inventores han descubierto que los 3 parámetros más cruciales para optimizar la calidad del producto final son: la proporción inicial de polisacárido/proteína; la concentración inicial del polisacárido; y el pH de acoplamiento.

35 Por tanto, se diseñó un cubo de reacción con las 3 condiciones anteriores como los tres ejes. Los puntos centrales (y el intervalo de valores experimentados) para estos ejes fueron: proporción de PS/proteína - 1/1 ($\pm 0,3/1$); [PS]= 5 mg/ml (± 2 mg/ml); y pH de acoplamiento= 8,0 ($\pm 1,0$ unidad de pH).

40 Los parámetros menos esenciales se fijaron en: se usaron 30 mg de polisacárido; temperatura 25°C; [CDAP]= 0,75 mg/mg de PS; pH titulado con NaOH 0,2M; pH de activación= 9,5; temperatura para activación= 1,5 minutos; temperatura de acoplamiento- 1 hora; [proteína]= 10 mg/ml; pH de inactivación= 9,0; temperatura de inactivación= 1 hora; temperatura de disolución de PS en disolvente= 1 hora en NaCl 2M, purificación en Sephacryl S-400HR eluido con NaCl 150 mM a 12 cm/jora; y filtración en esterilización con SARTOLAB P20 a 5 ml/min.

45 Los datos investigados para establecer condiciones optimizadas al hacer productos dentro del cubo de reacción mencionado anteriormente fueron: datos del procedimiento- rendimiento máximo tras la filtración, nivel máximo de la proteína incorporada; y calidad de los datos del producto- proporción final PS/proteína, nivel de PS libre, nivel de proteína libre, niveles mínimos de DMAP residual (un producto de la degradación de CDAP).

50 *Rendimiento de la filtración*

El factor que afecta al rendimiento tras la filtración es la interacción entre la [PS] inicial y el pH de acoplamiento y la proporción inicial de PS/proteína. A una [PS] baja existen poca interacción con los últimos 2 factores y siempre tiene como resultado una buena capacidad de filtración (aprox., 95% para todos los productos). No obstante, a con-
55 centraciones elevadas la capacidad de filtración disminuye si el pH y la proporción inicial aumentan ([PS] elevada, proporción menor, pH menor= filtración del 99%; pero [PS] elevada, proporción más elevada y pH= filtración del 19%).

Nivel de incorporación de la proteína

60 La proporción de la proporción final de PS/proteína en relación con la proporción inicial es una medida de la eficacia del acoplamiento. A [PS] elevada, el pH no afecta a la proporción de las proporciones. No obstante, la proporción inicial sí lo hace (1,75 a una proporción inicial baja, 1,26 a proporciones iniciales elevadas). A una [PS] baja, la proporción de proporciones es, en su mayor parte, menor, no obstante ahora el pH tiene más efecto (pH bajo, proporción
65 baja= 0,96; pH bajo, proporción elevada= 0,8; pH elevado, proporción baja= 1,4; y pH elevado, proporción elevada= 0,92).

ES 2 300 255 T3

Proporción final PS/proteína

La proporción final depende de la proporción inicial y la [PS]. Las proporciones finales más considerables se obtienen con una combinación de proporciones iniciales elevadas y [PS] elevada. El efecto del pH sobre la proporción final no es tan significativo como una [PS] débil.

Nivel de proteína D libre

Las cantidades menores de proteína D libre se observan a un pH elevado y a una [PS] elevada (niveles cercanos a 0,0). El efecto de la [PS] elevada se convierte en especialmente marcada cuando el pH es bajo. La elevación de la proporción inicial contribuye un poco al incremento de la proteína D libre.

DMAP residual

La proporción inicial no tiene un efecto significativo. En contraste con ello, el nivel de DMAP incrementa con la [PS] y disminuye cuando el pH aumenta.

Conclusiones

Las condiciones de conjugación más preferibles son, por tanto, las siguientes: pH de acoplamiento= 9,0; [PS]= 3 mg/ml; y una Proporción inicial = 1/1. Con tales condiciones, las características del producto final son las siguientes:

Proporción final de PS/proteína		Rendimiento en PS en la filtración (%)		Proporción de proporciones		Proteína D libre (%)		Niveles de DMAP (ng/10 µg de PS)	
Valor	Intervalo	Valor	Intervalo	Valor	Intervalo	Valor	Intervalo	Valor	Intervalo
1,10	0,91-1,30	92,6	50-38	1,16	1,03-1,29	0,71	0-10,40	4,95	2,60-7,80

Los conjugados de PRP obtenibles mediante el anterior procedimiento de CDAP mejorado (optimizado) (con independencia de la proteína portadora, pero preferentemente la proteína D) son, por tanto, otro aspecto de la invención.

Ejemplo 11

Proteína D como antígeno- cómo su eficacia protectora contra H. influenzae no tipificable puede mejorarse mediante su formulación con 3D-MPL

Ratones Balb/c (10 por grupo) fueron inmunizados (intramuscularmente) con la vacuna conjugada de polisacárido neumocócico-proteína D por primera vez a la edad de 20 semanas (DO) y recibieron una segunda inmunización dos semanas después (D14). Se recolectó sangre 7 días después de la segunda inmunización. Los títulos de anticuerpos contra la proteína D se midieron en términos de cantidad de los anticuerpos de tipo IgG1, IgG2a e IgG2b.

Se prepararon vacunas undecavalentes liofilizadas (sin AIPO4) mediante la combinación de los conjugados con 15,75% de lactosa, agitando durante 15 minutos a temperatura ambiente, ajustando el pH a $6,1 \pm 0,1$ y liofilizando (el ciclo normalmente comienza a -69°C , y gradualmente se ajusta hasta -24°C durante 3 horas, después esta temperatura se mantiene durante 18 horas y después se ajusta gradualmente hasta -16°C en 1 hora, esta temperatura se mantiene durante 6 horas, después se ajusta gradualmente hasta $+34^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas y, por último, esta temperatura se mantiene durante 9 horas).

La composición de las formulaciones y reconstituyentes para los liofilizados se presentan en la Tabla 13.

Se sabe que la medición más característica en cuanto a si se ha producido una respuesta inmunitaria de tipo Th1 mediada por células o no se correlaciona con el nivel de anticuerpos IgG2a. Como se puede observar de los datos se produce un incremento sorprendentemente grande en los resultados de IgG2a so la proteína D se ha liofilizado con un adyuvante Th1 (en este caso, 3D-MPL).

Tabla 13: Composición de las formulaciones (según la dosis humana) y los títulos de anticuerpos contra la proteína D en ratones (con 1/10 de la dosis)

Estado físico	PS (1500 µl)	AIPO ₄ (500 µl)	Inmuno estimulante	Agente apelmazante	Conservante	Reconstituyente	µg/ml			%		
							IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG1	IgG2a	IgG2b
Líquido	1 µg	500 µg	No	No	2-PE ³	No	76	0,425	0,24	99,1	0,554	0,313
Líquido	5 µg	500 µg	No	No	2-PE	No	66	0,284	0,176	99,3	0,427	0,265
Líquido	1 µg	0 µg	No	No	2-PE	No	6,6	0,207	0,036	96,4	3,02	0,526
Líquido	5 µg	0 µg	No	No	2-PE	No	5,2	0,169	0,043	96,1	3,12	0,795
Liofilizado	1 µg	0 µg	No	Lactosa 3,15%	No	NaCl 150 mM ¹	5,2	0,147	0,046	96,4	2,73	0,853
Liofilizado	5 µg	0 µg	No	Lactosa 3,15%	No	NaCl 150 mM ¹	11,1	0,11	0,168	97,6	0,967	1,477
Liofilizado	1 µg	0 µg	No	Lactosa 3,15%	No	AIPO ₄ 500 µg ²	45	1,86	0,075	95,9	3,96	0,160
Liofilizado	5 µg	0 µg	No	Lactosa 3,15%	No	AIPO ₄ 500 µg ²	19	0,077	0,119	99,0	0,401	0,620
Liofilizado	1 µg	0 µg	No	Lactosa 3,15%	No	MPL 50 µg ¹	45	2,6	3,5	88,1	5,09	6,849
Liofilizado	5 µg	0 µg	No	Lactosa 3,15%	No	MPL 50 µg ¹	135	25	5,1	81,8	15,1	3,089
Liofilizado	1 µg	0 µg	MPL (50 µg)	Lactosa	No	Tampón ¹	43	22	5,7	60,8	31,1	8,062

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende una pluralidad de antígenos conjugados polisacáridos que constan de un antígeno polisacárido derivado de una bacteria patogénica conjugada con la proteína D de *Haemophilus influenzae* o un fragmento de proteína D de la misma que comprende epítopos de células T colaboradoras.
- 10 2. La composición inmunogénica según la reivindicación 1, en la que los antígenos polisacáridos se seleccionan del grupo constituido por: polisacáridos Vi de *Salmonella typhi*, polisacáridos meningocócicos, polisacáridos y polisacáridos modificados de los meningococos del grupo B, polisacáridos de *Staphylococcus aureus*, polisacáridos de *Streptococcus agalactiae*, polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, polisacáridos de micobacterias, polisacáridos de *Cryptococcus neoformans*, lipopolisacáridos de *Haemophilus influenzae* no tipificable, polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae b*, lipopolisacáridos de *Moraxella catarrhalis*, lipopolisacáridos de *Shigella sonnei* y lipopeptidofosfoglucono (LPPG) de *Trypanosoma cruzi*.
- 15 3. La composición inmunogénica según la reivindicación 2, que comprende antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos cuatro serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.
- 20 4. La composición inmunogénica según la reivindicación 2, en la que los antígenos polisacáridos conjugados a la proteína D derivan de una combinación de los serotipos A, C o Y de *N. meningitidis*.
- 25 5. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende polisacáridos capsulares conjugados de *Haemophilus influenzae b*, meningococos C y meningococos Y, en los que los antígenos polisacáridos capsulares están conjugados a la proteína D de *Haemophilus influenzae*, con la condición de que el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae b* está conjugado con el toxoide del tétanos.
- 30 6. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende polisacáridos capsulares conjugados de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae b*, meningococos C y meningococos Y, en los que los antígenos polisacáridos capsulares están conjugados a la proteína D de *H. influenzae*, con la condición de que el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae b* está conjugado con el toxoide del tétanos.
7. Una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que adicionalmente comprende un adyuvante.
- 35 8. Una composición inmunogénica según la reivindicación 7, en la que los antígenos del conjugado polisacárido-proteína D se adsorben en fosfato de aluminio.
- 40 9. Una composición inmunogénica según la reivindicación 7, en la que el adyuvante es un inductor preferencial de una respuesta TH1.
- 45 10. Una composición inmunogénica según la reivindicación 9, en la que el adyuvante comprende al menos uno de los siguientes: 3D-MPL, un inmunoestimulante de saponina o un oligonucleótido de CpG inmunoestimulador.
11. Una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usar como medicamento.
12. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-10.
- 50 13. Un procedimiento de producir una composición inmunogénica para una pluralidad de bacterias patogénicas, que comprende las etapas de:
- aislar una pluralidad de antígenos polisacáridos de dichas bacterias patogénicas.
 - activar los polisacáridos;
 - 55 conjugar los polisacáridos con la proteína D de *H. influenzae*; y
 - mezclar los polisacáridos conjugados.
- 60 14. Un uso de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la infección por una bacteria patogénica.
- 65

Figura 1A

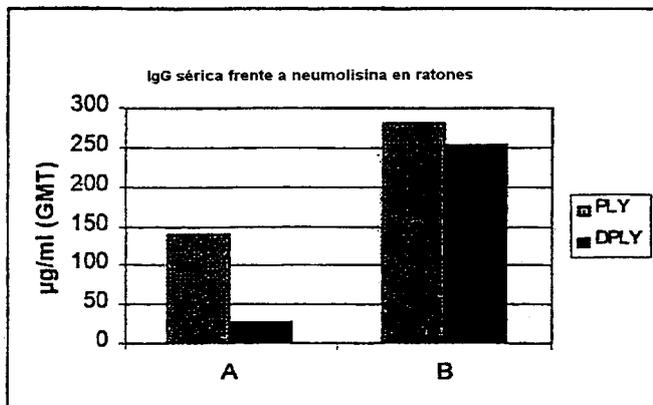


FIGURA 1B

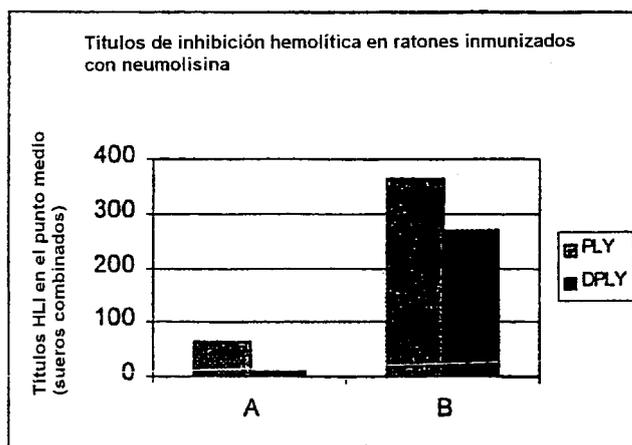


Figura 1C

