



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 724**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05797390 .1**

(86) Fecha de presentación : **20.09.2005**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1791860**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

(54) Título: **Procedimiento de purificación para la citolisina bacteriana.**

(30) Prioridad: **22.09.2004 GB 0421083**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

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

(72) Inventor/es: **Biemans, Ralph L.;**
Goraj, Carine;
Mertens, Emmanuel y
Vandercammen, A.

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento de purificación para la citolisina bacteriana.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la purificación de la citolisina bacteriana y, en particular, a un procedimiento de purificación de neumolisina. La neumolisina es una proteína de *Streptococcus pneumoniae* con buenas propiedades antigénicas, que es adecuada como un componente de vacuna contra la infección por *S. pneumoniae* u otitis media. El procedimiento de la invención describe una etapa infrecuente y ventajosa de purificar la neumolisina en una única etapa cromatográfica mediante su unión a una columna de interacción hidrofóbica en presencia de detergente y niveles elevados de sales. El procedimiento ha uso de forma ventajosa de la propiedad de las citolisinas bacterianas de tener una afinidad elevada por los compuestos aromáticos similares al colesterol, particularmente cuando están en un estado agregado y, por tanto, generalmente será aplicable para la purificación de miembros de esta familia de toxinas. Otro aspecto ventajoso de la invención es la preparación de la muestra a cargar en la columna mediante un procedimiento de rotura mecánica y prefiltración.

Las citolisinas activadas por tiol forman un grupo prominente de toxinas bacterianas de las que la estreptolisina O es el prototipo (Billington y col. FEMS Microbiol Lett. (2000), 182; 197-205). Estas toxinas son líticas para las células eucarióticas mediante la formación de poros en la membrana celular. Los agentes oxidantes afectan de forma adversa a su actividad citolítica, mientras que los agentes reductores pueden restablecer la actividad. Los miembros de este grupo muestra una similitud del 30-60% en la secuencia aminoacídica primaria y contienen una secuencia undecapeptídica casi invariable cerca del extremo C. El colesterol es el principal receptor celular diana para estas toxinas. Las citolisinas se unen a las membranas que contienen colesterol y se oligomerizan para formar poros transmembranales de hasta 30 nm de diámetro y compuestas por 40-80 subunidades monoméricas. La unión del colesterol de membrana induce un cambio conformacional en el monómero de la toxina y dirige los posteriores sucesos de oligomerización, inserción en membrana y formación de poros.

Streptococcus pneumoniae es el agente causante de varias enfermedades humanas, incluidas neumonía, bacteriemia, meningitis, otitis media y sinusitis. En ocasiones, estas enfermedades pueden producir muertes a pesar de la disponibilidad de antibióticos. La aparición de cepas resistentes a antibióticos de *S. pneumoniae* ha agravado los problemas causados por este patógeno. En este contexto, es importante desarrollar vacunas eficaces contra *S. pneumoniae*.

Las vacunas neumocócicas polivalentes que contienen polisacáridos capsulares purificados han estado disponibles durante varios años. Su aplicación está limitada por la mala inmunogenicidad, en particular en grupos de alto riesgo, incluidos lactantes, ancianos y los enfermos con anemia drepanocítica, mieloma múltiple, cirrosis o alcoholismo. También proporcionan protección específica de serotipo y sólo 23 de 90 serotipos conocidos están cubiertos por las formulaciones existentes. Esto conferirá protección contra el 90% de los serotipos encontrados en la población de EE.UU., pero sólo contra aproximadamente el 70% de los serotipos encontrados en las poblaciones asiáticas. Recientemente se ha dispuesto una vacuna conjugada heptavalente, que de igual modo tiene problemas para proteger contra todas las cepas neumocócicas.

La neumolisina (Ply) es una citolisina actividad por tiol de 53 kDa que se encuentra en todas las cepas de *S. pneumoniae*, que se libera con autólisis y contribuye a la patogenia de *S. pneumoniae*. Está altamente conservado con sólo unas pocas sustituciones de aminoácidos que se producen entre las proteínas Ply de diferentes serotipos. El alto grado de conservación de la neumolisina y su inmunogenicidad la convierten en un posible candidato como componente de vacuna. No obstante, la Ply de tipo salvaje no es adecuada para su incorporación en vacunas para usar en seres humanos por su toxicidad. La Ply causa daños en las membranas celulares a través de su interacción con el colesterol unido a la membrana y la oligomerización para formar poros en la membrana. Un motivo conservado que contiene cisteína encontrado cerca del extremo C se ha implicado en la actividad lítica. Se ha sugerido que las mutaciones de Ply reducen esta toxicidad (documentos WO 90/06951, WO 99/03884).

Lock y col. (Microbial Pathogenesis (1996) 21: 71-83) han descrito un procedimiento de dos etapas para la purificación de la neumolisina. La neumolisina recombinante se purifica a partir de un cultivo de *E. coli* usando una combinación de cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. El procedimiento implica las etapas de preparar un extracto y pasarlo a través de una columna de DEAE-Sefarosa, seguida por una columna de Sephacryl S200-HR. Este procedimiento podría usarse para purificar neumolisina recombinante o nativa.

Kuo y col. describen un procedimiento de purificar la proteína de fusión recombinante GST-neumolisina (Infection and Immunity (1995) 63; 2706-2713). La proteína de fusión se expresa en un cultivo de *E. coli* y un lisado celular se carga en un gel de agarosa con glutatión. La proteína de fusión eluye con glutatión y la trombina puede usarse para escindir la proteína de fusión. Las proteínas se pasaron a través de una columna de glutatión-sefarosa de nuevo para eliminar el GST, La neumolisina purificada por afinidad se purificó después usando una columna de hidroxipatito.

Mitchell y col. (BBA (1989) 1007; 67-72) describen un procedimiento para purificar la neumolisina usando cromatografía de interacción hidrofóbica. En las condiciones que usan (NaCl 250 mM), la neumolisina no se pudo unir fuertemente a la columna, aunque se retrasó su progreso y la neumolisina eluyó en forma de un pico ancho. Eran necesarias etapas adicionales para determinar qué fracciones contenían neumolisina pura, concentrar las fracciones

positivas, recargar la columna y eluir con un volumen pequeño de agua, para superar el problema de la falta de unión fuerte de la neumolisina al material de la columna.

Sigue existiendo una necesidad continua de vacunas mejores contra *S. pneumoniae*. La incorporación de un componente Ply es prometedora, aunque la toxicidad de la proteína sigue siendo un problema. También se requiere el desarrollo de un procedimiento rápido y eficaz para la purificación en masa de la neumolisina. Procedimientos descritos previamente implican el uso de múltiples etapas de purificación con ensayo intermedio y etapas de concentración. La presente invención proporciona un procedimiento de purificación más eficaz, que usa de forma ventajosa una única etapa de cromatografía, que se puede usar para purificar grandes lotes de neumolisina.

Descripción de las figuras

Figura 1- geles de SDS-PAGE que muestran la purificación de la neumolisina. Los paneles A y B muestran la purificación de la neumolisina siguiendo el procedimiento del ejemplo 1. El panel A muestra el gel tras la tinción con azul de coomassie. El panel B muestra el gel después de un procedimiento de Western blot usando anticuerpos anti-*E. coli* como sondas para proteínas contaminantes.

Las muestras siguientes se sometieron a geles de SDS-PAGE: calle 1- patrones de peso molecular, calle 2- sobrenadante de extractos celulares, calle 3- flujo de fenil-sefariosa, calle 4 primer lavado de la fenil sefariosa, calle 5- segundo lavado de la fenil-sefariosa, calle 6 lavado de la fenil sefariosa con NaCl 0,5M, calle 7 elución de fenil-sefariosa con tampón con bajos niveles de sales, calle 8 neumolisina después de las etapas de desnaturalización/repliegue, calle 9- neumolisina después de la filtración esterilizante.

El panel C muestra un gel de tinción con coomassie, que muestra la purificación de neumolisina siguiendo el procedimiento del ejemplo 2.

Las muestras siguientes se sometieron a geles de SDS-PAGE: - calle 1, patrones de peso molecular, calle 2- caldo de fermentación Rannie tratados, calle 3- filtro de caldo clarificado, calle 4- muestra clarificada de filtros diluida a DO60, calle 5- flujo en fenil-sefariosa, calle 5 lavado de fenil-sefariosa, calle 7 lavado de fenil sefariosa con NaCl 0,5M, calle 8 elución en fenil sefariosa con tampón de bajo nivel de sales, calle 9- neumolisina tras filtración esterilizante.

Figura 2- Análisis en SDS-PAGE de GMBS (éster de N-(γ -maleimidobutirilo) succinimida) neumolisina modificada- con tinción de azul de coomassie.

Las muestras siguientes se sometieron a un gel de SDS-PAGE: -calle 1- patrones de peso molecular, calle 2- neumolisina no modificada, calle 3- PLY tratada con GMBS en una proporción molar de GMBS/lisina de 4/1, calle 4- PLY tratada con GMBS en una proporción molar de GMBS/lisina de 4/1 e incubada durante 7 días a 37°C, calle 5- PLY tratada con GMBS en una proporción molar de GMBS/lisina de 8/1, calle 6-PLY tratada con GMBS en una proporción molar de GMBS/lisina de 8/1 tras la incubación durante 7 días a 37°C, calle 7- PLY tratada con sulfoacetato de NHS en una proporción molar de NHS/lisina de 10/1, calle 8- PLY tratada con NEM, calle 9- PLY tratadas con NEM tras 7 días de incubación a 37°C.

Figura 3- Toxicidad de neumolisina tratada con GMBS administrada a ratones por vía intranasal. La línea marcada con rombos indica un índice de supervivencia de los ratones expuestos a 2 μ g de neumolisina nativa. La línea marcada con cuadrados indica el índice de supervivencia de los ratones expuestos a 10 μ g de neumolisina tratada con GMBS.

Figura 4- Protección inducida por neumolisina tratada con GMBS en ratones expuestos por vía intranasal a neumolisina nativa. La línea marcada con rectángulos muestra el índice de supervivencia en ratones a los que se ha inoculado el adyuvante solo. La línea marcada con rombos indica el índice de supervivencia para ratones a los que se ha inoculado neumolisina nativa. La línea marcada con cuadrados indica el índice de supervivencia para ratones a los que se ha inoculado neumolisina tratada con GBMS.

Figura 5- Protección inducida mediante inoculación de PhtD y neumolisina tratada con GMBS en ratones expuestos por vía intranasal a la cepa neumocócica de tipo 2 D39. La línea marcada con rombos representa el índice de supervivencia de ratones a los que se ha inoculado PhtD. La línea marcada con cuadrados representa el índice de supervivencia de ratones a los que se ha inoculado PhtD y neumolisina tratada con GMBS.

Figura 6- Resultados del ELISA, que muestran los niveles de anticuerpos IgG anti-polisacáridos tras la inoculación del polisacárido simple tetravalente o de polisacáridos tetravalentes conjugados con neumolisina destoxificada con GMBS. El panel A muestra los niveles de IgG anti-PS8. El panel 8 muestra los niveles de IgG anti-PS12F. El panel C muestra los niveles de IgG anti-PS19F. El panel B muestra los niveles de IgG anti-PS22F.

Figura 7- GMT Opsono-fagocitosis tras la inoculación del polisacárido simple tetravalente o de polisacáridos tetravalentes conjugados con neumolisina destoxificada con GMBS. El panel A muestra los resultados de un ensayo de opsono-fagocitosis anti tipo 8. El panel B muestra los resultados de un ensayo de opsono-fagocitosis anti tipo 12F. El panel C muestra los resultados de un ensayo de opsono-fagocitosis anti tipo 19F. El panel B muestra los resultados de un ensayo de opsono-fagocitosis anti tipo 22F.

Descripción detallada*Procedimientos*

5 El procedimiento de la invención es un procedimiento para purificar una citolisina bacteriana tal como neumolisina. Una citolisina, por ejemplo neumolisina, se purifica usando una única etapa de cromatografía en columna. La proteína se une en forma agregada a una columna de interacción hidrofóbica en presencia de detergente y sales. Pocas proteínas se unen a la columna en estas condiciones y permiten la purificación de una citolisina en una única etapa. El procedimiento de la invención es particularmente aplicable a la purificación en masa de una citolisina dado que
 10 en una forma de realización preferida de la invención no se usa una centrífuga durante la preparación de un lisado a cargar en la columna. El uso de una centrífuga a menudo es una etapa limitante en el procedimiento de producción. En otras formas de realización preferidas de la invención, la etapa de desnaturalización/renaturalización se lleva a cabo a concentraciones de citolisina normalmente superiores a 100 µg/ml.

15 Para los fines de la invención, un agregado soluble de una citolisina, preferentemente neumolisina, es una forma agregada de la citolisina que permanece en el sobrenadante después de la centrifugación a 30.000 g durante 20 minutos. El agregado soluble queda retenido en el material de cromatografía por interacción hidrofóbica, preferentemente fenil-sefariosa, en presencia de un detergente y niveles elevados de sales, preferentemente 1M. Opcionalmente, el agregado soluble es coloidal.

20 La concentración de sales incluye la concentración de todas las sales, incluidas sales de tamponamiento, presentes en una solución o suspensión.

25 Para los fines de la invención, condiciones de niveles bajos de sales tienen una conductividad inferior a 5 mS/cm, preferentemente 1-2 mS/cm. Las condiciones de niveles elevados de sales tienen una conductividad superior a 30 mS/cm, preferentemente superior a 50 mS/cm, más preferentemente de 60-80 mS/cm.

La citolisina, preferentemente neumolisina, se une a la columna en forma de un agregado soluble. Es infrecuente cargar agregados en una columna por varios motivos, incluida la obstrucción de filtros o columnas y la pérdida de material. No obstante, usando un detergente, preferentemente a un pH alcalino, que reduce el tamaño de los agregados para formar un agregado soluble, se ha descubierto que estos agregados se unen fuertemente a la columna en condiciones con detergente pero pueden eluir a una pureza de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, preferentemente 90%, 95%, más preferentemente 97%, 98% o 99%, según se evalúa mediante análisis en SDS-PAGE sin que afecte de forma adversa a los filtros de la columna. Preferentemente, el procedimiento da un rendimiento de al menos 100, 200, 500, 700, más
 35 preferentemente 1000, 1500, 1700 o 1900 mg de citolisina, preferentemente neumolisina por litro de fermentación. Preferentemente, al menos un 1%, 2%, 5%, 7%, 9% o 10% de la proteína del cultivo de fermentación se recupera en forma de citolisina purificada, preferentemente neumolisina.

El procedimiento explota la capacidad de las citolisinas, tales como neumolisina, para unirse al colesterol y a otros compuestos aromáticos. Esta unión es particularmente fuerte cuando la citolisina está agregada, lo que permite que la citolisina se una en presencia de detergente. El procedimiento se puede extender a otros miembros de la familia de las citolisinas, ya que todos los miembros comparten la capacidad para unirse a compuestos aromáticos y formar poros. De hecho, el procedimiento podría usarse para purificar otras familias de proteínas que se unen al colesterol o a otros compuestos aromáticos y/o formar poros, preferentemente ambos.

45 En consecuencia, en una primera forma de realización se proporciona un procedimiento para la purificación de citolisinas bacterianas, que comprende las etapas de:

- a) crecimiento de un cultivo de células que expresan citolisina bacteriana;
- 50 b) romper mecánicamente el cultivo de células para formar un extracto;
- c) prefiltrar el extracto;
- 55 d) unir la citolisina bacteriana agregada soluble contenida en el extracto en presencia de detergente (preferentemente detergente alifático) a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica en condiciones de niveles elevados de sal (preferentemente 0,5-2M);
- 60 e) eluir la citolisina bacteriana en presencia de detergente (preferentemente detergente alifático) en condiciones de niveles bajos de sal (preferentemente 0-0,2M).

En una segunda forma de realización se proporciona un procedimiento para la purificación de citolisina bacteriana, que comprende las etapas de:

- 65 a) crecimiento de un cultivo de células que expresan citolisina bacteriana;
- b) romper mecánicamente el cultivo de células para formar un extracto;

c) prefiltrar el extracto;

d) unir la citolisina bacteriana agregada soluble contenida en el extracto en presencia de una solución que contiene sal 0,5-2M o 0,7-1,5M, preferentemente 0,8-1,2M y detergente 0,1%-1,5%, preferentemente 0,5-1,2%;

e) eluir la citolisina bacteriana usando una solución de niveles bajos de sal (preferentemente sal 0-0,2M) que contiene un 0,1-1,5%, preferentemente 0,5-1,2% de detergente.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el procedimiento de la invención comprende, preferentemente, las otras etapas de:

f) eliminar el detergente de la citolisina bacteriana

g) solubilizar la citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante:

h) eliminar el desnaturalizante de la citolisina bacteriana.

La siguiente descripción de la invención se aplica a cualquiera de las formas de realización enumeradas en lo que antecede.

El procedimiento de la invención puede usarse de forma ventajosa para purificar neumolisina neumocócica. Otras citolisinas que se pueden purificar mediante el procedimiento de la invención incluyen piolisina de *A. pyogenes*, ce-reolisina de *B. cereus*, turingiolisina de *B. thuringiensis*, laterosporolisina de *B. laterosporus*, bifermentolisina de *C. bifermentans*, botucinolisina de *C. botulinum*, chauveolisina de *C. chauvoel*, histoliticolisina de *C. hystolyticum*, edematolisina de *C. novyi* tipo A, perfringolisina de *C. perfringens*, septicolisina de *C. septicum*, soderlilisina de *C. sordeilii*, tetanolisina de *C. tetani*, ivanolisina de *L. ivanovi*, listeriolisina de *L. monocytogenes*, seeligerilisina de *L. seeligeri*, alveolisina de *P. alvei*, estreptolisina O de *S. pyogenes*, *S. canis* o *S. equisimilis*, intermedilisina de *S. inter-medius*, suilisina de *S. suis* o neumolisina de *S. pneumoniae*, que pueden ser de tipo salvaje o ser toxinas modificadas genéticamente con niveles menores de toxicidad, tal como PdA y PdB (documentos WO90/06951, WO99/03884).

Por neumolisina o Ply se quiere decir: neumolisina nativa de neumococos o neumolisina recombinante, neumoli-sina de tipo salvaje o mutantes de neumolisina (p. ej., los descritos en los documentos WO90/06951 y WO99/03884). Opcionalmente, neumolisina también puede significar cualquier fragmento de neumolisina o cualquier variante de neu-molisina que comparta al menos el 70, 80, 90 o 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de neumolisina de tipo salvaje (como se describe en Walter y col., 1987, Infect. Immun. 55; 1184-9 o Mitchell y col., 1990, Nucleic Acids Res. 18; 4010), que todavía retiene la capacidad de ser purificada mediante los procedimientos de la invención, como un experto determinará con facilidad.

En formas preferidas de realización de la invención, el mismo detergente está presente en las etapas b) y d), b) y e), d) y e), más preferentemente en las etapas b), d) y e). Preferentemente, el mismo detergente está presente en la etapa c), como está presente en las etapas b) y d), b) y e) o d) y e), más preferentemente en las etapas b), d) y e). Preferentemente, el detergente está presente a una concentración de 0,1%-1,5% (p/v), más preferentemente 0,5%-1,2% (p/v) o alrededor del 1% (p/v). Para los fines de la invención, un detergente alifático se define como un detergente sustancialmente alifático con insuficiente carácter aromático para prevenir la unión de citolisina a la columna en la etapa d). Preferentemente, el detergente tendrá uno o menos anillos aromáticos, más preferentemente no tiene ningún anillo aromático. Durante la etapa b), es ventajoso para el detergente romper agregados más grandes de citolisina en agregados más pequeños que forman un agregado soluble. Durante las etapas d) y e), el detergente retiene de forma ventajosa el estado de agregación soluble de la citolisina, lo que le permite unirse a la columna en condiciones de niveles elevados de sal con afinidad elevada.

La citolisina, preferentemente neumolisina, se expresa en un cultivo de células bacterianas, preferentemente *S. pneumoniae*, *E. coli*, o, como alternativa, de células de levadura, células de insecto, células de mamífero o cualquier otro sistema de expresión adecuado para su expresión. En los sistemas de expresión que producen rendimientos ele-vados de neumolisina, la neumolisina a menudo se agrega espontáneamente y el procedimiento de la invención es ideal para su purificación. Preferentemente, la neumolisina se expresa en rendimientos elevados, de modo que suma más de 2, 3, 4, 5, 7 o 10% de la proteína total en el sistema de expresión. Preferentemente, la neumolisina está en forma agregada y/o en su mayor parte desprovista de actividad hemolítica. Por ejemplo, la expresión en *E. coli* en un fermentador bajo el promotor del fago λ o de otros promotores que permiten una expresión elevada es bien conocida por el experto en la materia.

Preferentemente, la citolisina se extrae del sistema de expresión en forma de un agregado. Como alternativa, un sistema de expresión de menor rendimiento puede proporcionar citolisina soluble. En este caso, el extracto que contiene citolisina, preferentemente neumolisina, se ajusta a un pH inferior a 7,5 que permite que la citolisina se agregue durante un periodo de al menos 8 horas, preferentemente de al menos 24 horas.

ES 2 304 724 T3

La rotura mecánica en la etapa b) implica, preferentemente, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más etapas de rotura mecánica de las células (opcionalmente mediante pases de Rannie) y/o tratar las células con detergente. Si se ha preparado con un procedimiento de rendimiento elevado, la neumolisina permanece en forma de agregados, pero los agregados deberían ser lo bastante pequeños como para que permanezcan en el sobrenadante tras la centrifugación de la muestra en condiciones necesarias para sedimentar los residuos celulares insolubles. Preferentemente, el detergente usado en la invención es un detergente alifático que no contiene anillos aromáticos, preferentemente un detergente iónico, más preferentemente un detergente catiónico o aniónico, y más preferentemente, el detergente es sarcosinato de lauroilo sódico. Los detergentes preferidos pueden solubilizar la neumolisina mientras la dejan en forma de agregados pequeños que se unen a la columna de interacción hidrofóbica sin causar bloqueo de los filtros unidos a la columna. Los detergentes preferidos pueden reducir el tamaño de los agregados de neumolisina, lo que permite que los agregados de neumolisina sean lo suficientemente pequeños como para que permanezcan en el sobrenadante tras la centrifugación de la muestra a 30.000 g durante 20 minutos. Tales agregados solubles son purificables como tales en la columna de interacción hidrofóbica. El detergente está presente a una concentración de entre 0,1% y 1,5%, preferentemente 0,5% y 1,2% (p/v), más preferentemente alrededor de 1%. Preferentemente, el detergente es dializable.

Tras la alteración mecánica y/o con detergente del cultivo en la etapa b), el procedimiento de la invención incluye una etapa de prefiltración c) para eliminar el material agregado más grande que podría bloquear la columna en las etapas siguientes. Preferentemente, la etapa de prefiltración usa un filtro con un tamaño de poro de 0,4 μm , 0,65 μm , 1,2 μm , 2,45 μm o 5 μm . Preferentemente, el filtro tiene un tamaño de poro de 0,45-2,5 μm o 0,6-1,2 μm . Preferentemente, las etapas de rotura mecánica y de prefiltración permiten que el procedimiento de la invención evite el uso de centrifugación.

Opcionalmente, el procedimiento de la invención contiene una etapa de preincubación en la que el cultivo de células se incuba con detergente antes de romper mecánicamente el cultivo de células. La etapa de preincubación implica la adición de los detergentes descritos en lo que antecede durante al menos 1, 5, 10, 20, 30, 60 ó 120 minutos antes de la rotura mecánica del cultivo de células.

Preferentemente, la etapa b) y/o c) se lleva a cabo a pH alcalino, preferentemente a un pH de 8-10, 8,5-9,5 o de alrededor de 9. Preferentemente, las etapas f), g) y h) se llevan a cabo a un pH alcalino, preferentemente a un pH de 8-10, 8,5-9,5 o de alrededor de 9. Preferentemente, la etapa d) y/o e) se lleva a cabo a pH neutro, preferentemente a un pH de 6-8, 6,5-7,5 o de alrededor de 7. Preferentemente, la etapa b) y/o c) se lleva a cabo a una concentración de sal de 0-0,1M, más preferentemente de 10-50 mM o de 20-30 mM. Preferentemente, las etapas f), g) y h) se llevan a cabo a una concentración de sal de 0-0,1M, más preferentemente de 10-50 mM o de 20-30 mM.

El procedimiento de la invención usa cromatografía de interacción hidrofóbica para purificar la neumolisina en una única etapa. El material de columna usado en la etapa d) contiene, preferentemente, grupos aromáticos, preferentemente grupos fenilo y, más preferentemente, es fenil-sefaroasa.

La solución usada en la etapa d) y/o la etapa e) durante la carga y elución de la columna comprende un detergente iónico, preferentemente un detergente catiónico o aniónico, preferentemente un detergente que es soluble a concentraciones de sal por encima de 0,5M, más preferentemente el detergente es sarcosinato de lauroilo sódico. El detergente usado es uno que reducirá el tamaño de la citolisina, preferentemente neumolisina, agregados, que permiten que la citolisina esté presente en la muestra en forma de un agregado soluble de modo que se una al material de columna de interacción hidrofóbica sin quedar atrapado irreversiblemente en la columna. El detergente está presente a una concentración de, preferentemente, entre 0,1% y 1,5%, preferentemente de 0,5% y 1,2% (p/v), más preferentemente entre 0,75% y 1,2%, más preferentemente alrededor de 1%.

La solución usada en la etapa d) y/o e) contiene una sal, preferentemente una sal seleccionada del grupo compuesto por cloruro sódico, cloruro de magnesio, cloruro amónico, sulfato sódico, sulfato magnésico, sulfato amónico, fosfato sódico, fosfato de magnesio, fosfato amónico, y está tamponada, preferentemente, a un pH 6-8, preferentemente a un pH de alrededor de 7. Puede usarse cualquier tampón capaz de mantener el pH a un valor establecido de pH entre 6 y 9.

La solución usada para unir la neumolisina a la columna en el procedimiento de la invención contiene una elevada concentración de sal, preferentemente 0,6-2M, más preferentemente de alrededor de 1M. La concentración de sal se escoge de modo que la neumolisina esté en una forma agregada soluble y que pueda unirse al material de cromatografía hidrofóbica.

Normalmente una única columna de purificación puede purificar una citolisina, preferentemente neumolisina, hasta obtener una pureza de al menos 90, 92, 94, 96, 98 o 99%. No obstante, en algunas formas de realización de la invención, en las que se usa un tamaño de columna pequeño o en las que se carga en la columna una cantidad grande de citolisina, preferentemente neumolisina, para obtener niveles más elevados de pureza se pueden usar 1, 2, 3 o más pases por una columna similar en las condiciones descritas antes.

Opcionalmente, la etapa d) puede contener una etapa adicional de lavado de la columna a concentraciones intermedias de sal de alrededor de una concentración de sal de 0,5M o a una concentración de sal capaz de eliminar todas las impurezas con unión escasa.

El procedimiento de la invención usa un gradiente decreciente de sal para eluir la neumolisina de la columna. Preferentemente, la solución con concentraciones bajas de sal usada para preparar el gradiente de sal en la etapa e) contiene una concentración de sal entre 0-0,1M, más preferentemente de 0-40 mM. Como alternativa se puede usar una elución escalonada con el tampón de niveles bajos de sales usado en la etapa e) que contiene niveles de sales de entre 0-0,2M, más preferentemente niveles de sales de 0-40 mM.

Si se prefiere desnaturalizar la neumolisina y volverla a plegar después mediante la eliminación del desnaturalizante se pueden añadir etapas opcionales al procedimiento de la invención. Estas etapas opcionales garantizan que se obtiene citolisina, preferentemente neumolisina, pura con una estructura nativa y/o actividad biológica (p. ej., hemólisis de eritrocitos). La primera etapa opcional f) implica la eliminación del detergente mediante diafiltración, diálisis o dilución. Preferentemente, esta etapa implica diafiltración/diálisis contra un tampón de pH 8-10, preferentemente de aproximadamente 9, más preferentemente el tampón es uno que puede tamponar a valores de pH alcalino, más preferentemente el tampón es dietanolamina (DEA). Preferentemente, la solución es de baja fuerza iónica, preferentemente de 10-50 mM, más preferentemente de alrededor de 25 mM. La diafiltración o la diálisis se lleva a cabo, preferentemente, a 4°C, pero como alternativa se lleva a cabo a temperatura ambiente.

En una segunda etapa opcional, la citolisina, preferentemente neumolisina, se desnaturaliza y solubiliza mediante la adición de un desnaturalizante. Preferentemente, el desnaturalizante usado en la etapa g) es clorhidrato de guanidina, más preferentemente clorhidrato de guanidina 5-8M, más preferentemente clorhidrato de guanidina aproximadamente 6M. La neumolisina se incuba con clorhidrato de guanidina durante al menos 10 minutos, preferentemente durante al menos 1 hora, más preferentemente durante aproximadamente una hora.

A continuación, durante la etapa g) la citolisina, preferentemente neumolisina, se pone en contacto con urea 5-9 M, preferentemente urea de alrededor de 8M. Esto se consigue mediante diafiltración o diálisis de la citolisina, preferentemente neumolisina, contra urea. Preferentemente, durante el intercambio de desnaturalizante se mantienen el mismo tampón y pH. Preferentemente, durante el intercambio de desnaturalizante se añade un agente reductor (DTT, 2-mercaptoetanol o glutatión).

Preferentemente, la etapa g) implica poner en contacto la citolisina, preferentemente neumolisina, con clorhidrato de guanidina 5-8M, seguido por intercambio de clorhidrato de guanidina por urea 5-9M.

Con el fin de evitar la formación de enlaces disulfuro inadecuados mientras se desnaturaliza la citolisina, preferentemente neumolisina, es ventajoso asegurar que está presente un agente reductor durante al menos parte de las etapas g) y h). Un agente reductor preferido es 0,1-10 mM de DTT, preferentemente DTT a alrededor de 1 mM. Como alternativa se usa glutatión o 2-mercaptoetanol. La concentración preferida de glutatión es de 1-20 mM o de 5-15 mM, más preferentemente de 5-10 mM.

La etapa h) opcional implica la eliminación del desnaturalizante con el fin de volver a plegar la citolisina, preferentemente neumolisina, preferentemente mediante diafiltración o diálisis contra un tampón con niveles bajos de sales de pH 6-10, preferentemente de aproximadamente 9. Preferentemente, el desnaturalizante se elimina de modo lineal en lugar del modo logarítmico normalmente asociado con la diálisis o la diafiltración. Es decir, el desnaturalizante se elimina a una velocidad más lenta al comienzo de la etapa de diafiltración que al final. Esto contrasta con la mayoría de los procedimientos en los que el desnaturalizante se elimina a una velocidad más rápida hacia el principio del procedimiento. Esto se consigue llevando a cabo la diafiltración a caudales de recirculación progresivamente más elevados o la diálisis contra soluciones que contienen progresivamente menos desnaturalizante. Por ejemplo, la diafiltración se puede llevar a cabo a velocidades de entre 50 ml/hora y 500 ml/hora y la velocidad de diafiltración se puede incrementar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. Preferentemente, la concentración de citolisina, preferentemente neumolisina, se mantiene a al menos 100 µg/ml, preferentemente entre 100 µg/ml y 1000 µg/ml, más preferentemente a aproximadamente 500 µg/ml. Opcionalmente, la diafiltración o la diálisis se realizan contra un tampón que contiene propilenglicol entre el 10 y el 30%, preferentemente a aproximadamente un 15%. Preferentemente, durante la etapa h) se mantiene un agente reductor como se ha descrito en lo que antecede. Preferentemente, la diafiltración o la diálisis se llevan a cabo a 4°C, pero, como alternativa, se lleva a cabo a temperatura ambiente. El procedimiento de replegamiento es aplicable a otras proteínas.

Otra etapa (i) opcional implica la eliminación del agente reductor después del replegamiento de la citolisina, preferentemente neumolisina. Esto se consigue, preferentemente, mediante diafiltración o diálisis contra un tampón con niveles bajos de sales de pH 7-10, preferentemente a pH de aproximadamente 9. Opcionalmente, la diafiltración o la diálisis se realizan contra un tampón que contiene propilenglicol entre el 10 y el 30%, preferentemente a aproximadamente un 15%. Preferentemente, la diafiltración o la diálisis se llevan a cabo a 4°C, pero, como alternativa, se lleva a cabo a temperatura ambiente.

En procedimientos preferidos de la invención, la citolisina, preferentemente neumolisina, se vuelve a plegar de modo que su actividad hemolítica se restablezca por encima del 25%, 50%, 75%, más preferentemente a por encima del 90% de la de la misma cantidad de la proteína adecuadamente plegada. Para los fines de la invención, la proteína "plegada" es una proteína que tiene la estructura terciaria de la proteína preparada mediante un procedimiento no desnaturalizante. En el caso de la neumolisina de tipo salvaje, la actividad hemolítica prevista de la neumolisina que se ha vuelto a plegar sería 500.000-1.000.000 unidades hemolíticas/mg de neumolisina. En el caso de neumolisina con mutación puntual con una actividad hemolítica menor, la actividad hemolítica de la neumolisina que se ha vuelto a plegar sería correspondientemente menor.

Destoxificación de una toxina

La citolisina purificada mediante el procedimiento de la invención, preferentemente neumolisina, puede someterse a otra etapa opcional de destoxificación mediante tratamiento químico. Esta etapa adicional es particularmente ventajosa si la citolisina, preferentemente neumolisina, se ha de administrar a un animal o a un ser humano. La neumolisina de tipo salvaje es altamente tóxica. Se han aislado varias proteínas de neumolisina mutadas que tiene una toxicidad reducida, aunque éstas siguen conservando una toxicidad residual que puede suponer un problema cuando la neumolisina se administra internamente (documentos WO99/03884, WO90/06951). Como alternativa, se puede destoxificar mediante conjugación con sacáridos (documento WO96/05859).

El procedimiento de la invención puede destoxificar la citolisina de tipo salvaje o mutada, por ejemplo neumolisina mediante tratamiento químico. Formas de realización preferidas usan un agente de reticulación, más preferentemente que contengan uno o más compuestos químicos seleccionados del grupo compuesto por formaldehído, glutaraldehído y un reactivo de reticulación que contiene un éster de N-hidroxisuccinimido y/o un grupo maleimida (p. ej., GMBS).

Los propios procedimientos de destoxificación son un aspecto de la invención y pueden usarse para destoxificar las toxinas bacterianas, preferentemente neumolisina preparada mediante otros procedimientos.

En una forma de realización, el procedimiento de destoxificación de la invención describe la destoxificación de una toxina bacteriana, que comprende tratar la toxina con un compuesto químico, preferentemente un reactivo de reticulación que es reactivo, preferentemente preferencialmente reactivo, más preferentemente específicamente reactivo con grupos amina, más preferentemente grupos amina primarias.

Para los fines de esta aplicación, un reactivo de reticulación se define como un compuesto con al menos dos grupos reactivos, al menos uno de los cuales puede reaccionar con al menos un grupo de la toxina bacteriana. Otro grupo reactivo puede reaccionar con un grupo cualquiera de los de la toxina bacteriana o un compuesto distinto (por ejemplo, un aminoácido, péptido, polipéptido, azúcar o polisacárido).

Preferentemente, el compuesto químico o el reactivo de reticulación es reactivo, más preferentemente preferencialmente reactivo, más preferentemente específicamente reactivo con grupos amina y sulfhidrilo. Preferentemente, el compuesto químico reacciona con un grupo amino primario de lisina, más preferentemente, el reactivo de reticulación reacciona con un grupo amino primario de lisina y el grupos sulfhidrilo de cisteína. Este procedimiento es particularmente ventajoso cuando la neumolisina se destoxifica, ya que la modificación de los residuos de cisteína y lisina conduce a una disminución sinérgica al nivel de hemólisis en comparación con la actividad de hemólisis residual en la que el reactivo de reticulación reacciona con sólo lisina o cisteína.

Por tanto, una forma de realización alternativa proporciona un procedimiento de destoxificación de toxinas bacterianas, que comprende modificar un residuo de cisteína (opcionalmente cerca del extremo C de la toxina) implicado en la actividad tóxica de la toxina (preferentemente, la actividad lítica), que comprende tratar la toxina con un reactivo de reticulación (preferentemente un reactivo de reticulación heterobifuncional) que reticula los grupos sulfhidrilo con otro aminoácido de la toxina, preferentemente alejado más de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 aminoácidos de la cisteína en la estructura primaria. Preferentemente, el otro aminoácido contiene un grupo amino primario y, más preferentemente, el aminoácido es lisina.

En algunas formas de realización, más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la toxina conserva un peso molecular dentro del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, más preferentemente entre 1-50%, más preferentemente entre 5-10%, de su peso molecular original tras el tratamiento, evaluado mediante SDS-PAGE. Preferentemente, la toxina adquiere un peso molecular ligeramente superior tras el tratamiento de destoxificación debido a que varios residuos aminoacídicos se modifican mediante unión covalente al compuesto químico. No obstante, preferentemente, el procedimiento de la invención no implica una amplia conjugación de la toxina, bien mediante unión covalente a otras moléculas de toxina de modo que se forma una toxina con una estructura cuaternaria monomérica, bien mediante unión covalente de la toxina a otras proteínas, polisacáridos o lipopolisacáridos grandes. Más preferentemente, los procedimientos, proteínas o productos descritos en el documento WO96/05859 no están cubiertos por esta invención.

Los procedimientos de la invención pueden usarse para destoxificar las toxinas bacterianas. Entre las toxinas preferidas se incluyen las citolisinas activadas por tiol, piolisina de *A. pyogenes*, cereolisina de *B. cereus*, turingiolisina de *B. thuringiensis*, laterosporolisina de *B. laterosporus*, bifermentolisina de *C. bifermentans*, botucinolisina de *C. botulinum*, chauveolisina de *C. chauvoel*, histoliticolisina de *C. hystolyticum*, edematolisina de *C. novyi* tipo A, perfringolisina de *C. perfringens*, septicolisina de *C. septicum*, soderlisina de *C. sordellii*, tetanolisina de *C. tetani*, ivanolisina de *L. ivanovi*, listeriolisina de *L. monocytogenes*, seeligerilisina de *L. seeligeri*, alveolisina de *P. alvei*, estreptolisina O de *S. pyogenes*, *S. canis* o *S. equisimilis*, internedilisina de *S. intermedius*, suilisina de *S. suis* o neumolisina de *S. pneumoniae*, que pueden ser de tipo salvaje o ser toxinas modificadas genéticamente con niveles menores de toxicidad, tal como PdA y PdB (documentos WO90/06951, WO99/03884).

El procedimiento también se puede usar para destoxificar las toxinas de Neisseria FrpA, FrpC (documento WO92/01460), FrpB (Microbiology 142; 3269-3274, (1996); J. Bacterial. 181; 2895-2901 (1999)) NM-ADPRT (Decimotercera Conferencia Internacional sobre Neisseria patógena 2002 Masignani y col., pág. 135). FrpA y FrpC contienen

una región que está conservada entre estas dos proteínas y un fragmento preferido de las toxinas sería un polipéptido que contiene este fragmento conservado, que comprende, preferentemente, los aminoácidos 227-1004 de la secuencia de FrpA/C.

5 El procedimiento también se puede usar para destoxificar las toxinas de Bordetella, incluidas la adenilato ciclase (CyaA) (Glaser (1988) Mol. Microbiol. 2, 19-30), la toxina dermonecrótica (Livey (1984) J. Med. Microbiol. 17; 91-103) y la toxina pertussis (TP) (Munoz y col. (1981) Infect Immun 33; 820-826). El procedimiento de la invención también es útil para destoxificar la toxina del tétanos (TT) y la toxina diftérica (TD) y la toxina de *S. aureus* y *S. epidermidis*, incluidas las autolisinas (AtlE, amidasa y glucosaminidasa), proteína de unión sialoproteína de
10 unión al hueso (HarA) y hemolisina (documentos WO 01/98499; WO 02/59148; WO03/11899 locus 1, 2, 3, 5, 7, 78, 84).

Los procedimientos de la invención conducen a una reducción de la cantidad de toxicidad y/o la actividad hemolíticas de la toxina de al menos un 90%, preferentemente un 95%, 96%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% o 99,99%. (La
15 actividad hemolítica se mide usando el procedimiento del Ejemplo 3 y la toxicidad puede medirse mediante el procedimiento del Ejemplo 5.). La neumolisina nativa tiene una actividad hemolítica de 500.000-1.000.000 unidades por mg de neumolisina. Algunas variantes de la neumolisina con mutación puntual tienen una toxicidad y una actividad hemolítica reducidas. La destoxificación de una variante de neumolisina puede no ser capaz de conseguir una disminución del porcentaje tan elevada de la actividad hemolítica debido a la menor forma del punto de partida cuya actividad
20 hemolítica está reducida, no obstante se ha previsto que la mayor parte de la actividad hemolítica se elimina mediante los procedimientos de la invención.

La etapa de destoxificación del procedimiento de la invención proporciona, preferentemente, una reacción de reticulación que es sustancialmente no reversible. La reversibilidad se evalúa mediante la monitorización del nivel
25 de actividad hemolítica de la toxina destoxificada directamente tras la destoxificación y después de incubar a una temperatura por encima de 25°C, preferentemente por encima de 30°C, más preferentemente por encima de 35°C, más preferentemente por encima de 37°C durante al menos 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días. Una reacción sustancialmente no reversible tiene como resultado una destoxificación sustancialmente no reversible y se define como una reacción en la que el nivel de actividad hemolítica se eleva en menos de un 100%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% tras la incubación
30 a una temperatura elevada, como se ha descrito en lo que antecede. Muchos procedimientos de destoxificación, por ejemplo mediante el uso de tratamiento con formaldehído, tienen como resultado una destoxificación que no es estable pero incrementa la toxicidad con el tiempo.

En una etapa de destoxificación preferida del procedimiento de la invención más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,
35 95% o 98% de la toxina conserva una estructura cuaternaria monomérica tras la reacción de reticulación. Muchos reactivos de reticulación forman reticulaciones intermoleculares (por ejemplo formaldehído y glutaraldehído). Esto puede afectar a las propiedades inmunológicas de la toxina, ya que algunos epítopos estarán escondidos en el interior del agregado. Los procedimientos de la invención implican, preferentemente, simplemente modificar los residuos de aminoácidos, preferentemente los grupos sulfhidrilo y/o de amino primarios de los aminoácidos y/o la formación
40 de reticulaciones principalmente intramoleculares. La estructura cuaternaria monomérica resultante permite que los epítopos permanezcan expuestos en la superficie de la toxina.

En una forma de realización preferida de la etapa de destoxificación, el reactivo de reticulación es heterobifuncional. Los reactivos de reticulación preferidos contienen un grupo éster de N-hidroxisuccinimida que reacciona
45 preferencialmente, más preferentemente específicamente, con grupos amina primarias. Preferentemente, el reactivo de reticulación contiene un grupo maleimida que reacciona preferencialmente, más preferentemente específicamente, con grupos sulfhidrilo. A un pH de aproximadamente 7, un grupo maleimida reacciona 1000 veces más rápido con los grupos sulfhidrilo de lo que lo hace con las aminas. Preferentemente, el reactivo de reticulación contiene un grupo éster de N-hidroxisuccinimida y un grupo maleimida. Preferentemente, el agente de reticulación no se puede escindir
50 usando un agente reductor, ya que esto conduce a una destoxificación menos eficaz.

La distancia entre los grupos reactivos del reactivo de reticulación puede afectar a la eficacia de la destoxificación. Preferentemente, la distancia entre los grupos del reactivo de reticulación que son reactivos con los grupos amina y sulfhidrilo está entre 1,5 y 20 Angstroms, más preferentemente entre 5 y 15 Angstroms y más preferentemente
55 alrededor de 10 Angstroms en el procedimiento de la invención. Preferentemente, los residuos aminoácidos en la toxina bacteriana se modifican mediante la adición de un grupo de una longitud de aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 500 Angstroms. Preferentemente, el grupo modificante tiene un tamaño de entre 5 y 100 Angstroms, más preferentemente de entre 10 y 20 Angstroms.

La etapa de destoxificación del procedimiento de la invención permite la modificación de suficientes residuos, de modo que la interferencia esteárica y/o los cambios conformacionales inhiben la función de la toxina bacteriana. Preferentemente se modifican al menos 5, 7, 10, 12, 14, 15, 20 ó 25 residuos aminoácidos de la toxina bacteriana. Cuanto en el reactivo de reticulación están presentes grupos de maleimida sin reaccionar se puede usar una reacción de
60 Ellman para estimar (indirectamente) el número de moléculas reticuladoras unidas a cada molécula de toxina (Ellman 1959 Arch. Biochem. Biophys, 82; 70).

Reactivos de reticulación preferidos son SMPT, Sulfa-LC SMPT, Sulfa-KMUS, LC-SMCC, KMUA, Sulfo-LC-SPDP, LC-SPDP, SMPB, Sulfa-SMPB, SMPH, Sulfa-SMCC, SMCC, SIAB, Sulfa-SIAB, GMBS (éster de N-(y-

maleimidobutiriloxi) succinimida), Sulfa-GMBS, MBS, Sulfa-EMCS, EMCA, EMCS, BMPS, SPDP, SBAP, BMPA, AMAS, SATP y SIA (Pierce).

En un procedimiento preferido de la invención, la toxina se trata con el compuesto químico o reactivo de reticulación en condiciones de pH de entre 5,0 y 9,0, preferentemente 6,5 a 8,0, más preferentemente de 7,0 a 7,8. En los tratamientos en los que se estimula la reacción de un grupo maleimida con un grupo sulfhidrilo, el pH preferido de la reacción es 6,0 y 8,0, más preferentemente de 6,5 y 7,5. La concentración preferida de sales durante la reacción está entre 100 mM y 1 M, más preferentemente 150 mM y 500 mM, más preferentemente entre 200 mM y 300 mM. No obstante, los inventores han descubierto que en ocasiones es preferible realizar la reacción a un nivel bajo de sales sin añadir cloruro sódico ni otra sal. Cuando la reacción se efectúa a un pH entre 7,6 y 7,8, la reacción se puede llevar a cabo, opcionalmente, sin la adición de sal. De igual modo, el uso de proporciones superiores de GMBS y la toxina se puede realizar sin la adición de sal a valores de pH entre 7,0 y 8,0.

Preferentemente se usa un exceso molar del compuesto químico o del reactivo de reticulación de 50-500 veces más, más preferentemente de 130-350 o de 350-900, más preferentemente de 250. La neumolisina neumocócica contiene 31 residuos de lisina. Por tanto, un exceso molar de 248 veces del compuesto químico o del reactivo de reticulación sobre la neumolisina es equivalente a un exceso molar de 8 veces del compuesto químico o el reactivo de reticulación con respecto a cada residuo de lisina. Preferentemente, en los procedimientos de la invención se usa una proporción molar entre el compuesto químico o el reactivo de la reticulación y los residuos de lisina 2-20 veces mayor, más preferentemente 4-15 veces o 15-30 veces, más preferentemente de aproximadamente 8 veces.

El tratamiento con el reactivo de reticulación progresa durante al menos 15 minutos, preferentemente durante al menos 30 minutos, más preferentemente durante alrededor de una hora a entre 4°C y 40°C, preferentemente a 15°C y 25°C, más preferentemente a temperatura ambiente. El procedimiento de la invención puede además comprender una etapa de inactivación usando un compuesto que contiene un grupo sulfhidrilo, preferentemente el compuesto inactivador tiene un peso molecular de alrededor de 50, 100 ó 120, más preferentemente el reactivo inactivador es un aminoácido tal como cisteína. Como alternativa, los grupos pueden hacerse reaccionar con un péptido o resto polisacárido capaz de reaccionar con maleimida, por ejemplo un péptido que contiene un residuo de cisteína. Esto es particularmente adecuado cuando los grupos de maleimida sin reaccionar están presentes antes de la etapa de inactivación.

La etapa de destoxificación es adecuada para usar sobre toxinas bacterianas tal y como se ha descrito en lo que antecede. Preferentemente, la toxina bacteriana es de *Streptococcus pneumoniae*, más preferentemente la toxina es neumolisina. La neumolisina es una proteína nativa o recombinante o una proteína que se ha sometido a ingeniería genética para reducir su toxicidad (como se ha descrito en lo que antecede). Las proteínas de fusión de las toxinas, preferentemente neumolisina o fragmentos de toxinas, preferentemente neumolisina, pueden destoxificarse usando el procedimiento de la invención.

Por tanto, en una forma de realización preferida, una toxina (como neumolisina) se destoxifica con un reactivo de reticulación que es, preferentemente, heterobifuncional que tiene grupos que son reactivos con residuos de lisina y de cisteína, y que es de un determinado tamaño, más preferentemente que tiene entre los grupos reactivos hay un espacio de 10-20 Angstroms, de modo que se producen las dos situaciones siguientes o, preferentemente, ambas:

- a) entre 5 y 30, preferentemente alrededor de 12-14, residuos aminoácidos de la toxina son modificados por la unión covalente de una molécula de reticulación preferentemente a un residuo de lisina o de arginina (preferentemente, medida indirectamente mediante una reacción de Ellman), habiéndose inactivado el otro extremo (preferentemente con cisteína) y/o;
- b) una cadena lateral de cisteína implicada en la actividad tóxica de la toxina (preferentemente situada hacia el extremo C de la toxina) está reticulada con otra cadena lateral de la toxina (preferentemente con un residuo de lisina o de arginina), que está separada del residuo de cisteína en la secuencia primaria de la toxina por, preferentemente, más de 2, 5, 10, 20, 30 o 40 aminoácidos.

En otra forma de realización preferida, una toxina (preferentemente neumolisina) se destoxifica con un compuesto químico monofuncional que reacciona, preferentemente, con los aminoácidos que contienen un grupo amino primario, más preferentemente lisina, y es de un tamaño determinado, más preferentemente de 10-00 Angstroms, de modo que la toxina esté cubierta con entre 5 y 30, más preferentemente con alrededor de 14, compuestos químicos unidos a los residuos aminoácidos.

Conjugados de polisacáridos

Un problema asociado con el enfoque polisacárido de la vacunación es el hecho de que los polisacáridos *per se* son malos inmunógenos. Para superar esto, los polisacáridos pueden estar conjugados con portadores proteicos, que proporcionan ayuda de las células T adyacentes. El procedimiento de la invención puede contener de un modo ventajoso otra etapa de conjugación de la citolisina, preferentemente neumolisina, a un polisacárido bacteriano, por ejemplo un lipo-oligosacárido o, preferentemente, un polisacárido capsular.

Un conjugado preferido comprende citolisina, preferentemente neumolisina, obtenida mediante el procedimiento de la invención conjugada a polisacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos polisacáridos capsulares neumocócicos se seleccionan, preferentemente, de 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 33F (más preferentemente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 223F) o mezclas de dos o más de dichos conjugados (4, 7, 9, 11, 13 ó 23).

La citolisina, preferentemente neumolisina, purificada mediante el procedimiento de la invención, también se conjugaba, preferentemente, a los polisacáridos o lipopolisacáridos o lipooligosacáridos capsulares de otras cepas de bacterias. Tales polisacáridos pueden aislarse de, por ejemplo, *H. influenzae*, *H. influenzae* de tipo B (Hib), *N. meningitidis*, estreptococos distintos a *S. pneumoniae* (p. ej., estreptococos del grupo B, *S. pyogenes*, etc.), estafilococos (p. ej., *S. aureus*, *S. epidermidis*), *E. coli*, enterococos (p. ej., *E. faecalis* y *E. faecium*), etc. Preferentemente, los polisacáridos son de *H. Influenzae* de tipo B (Hib) y/o de *N. meningitidis* de los grupos A, C, W135 y/o Y. Entre los lipooligosacáridos preferidos se incluyen los de *N. meningitidis* (inmunotipos L2, L3, L4 y/o L6), *M. catarrhalis* y *H. Influenzae*.

El polisacárido puede unirse a la citolisina, preferentemente neumolisina, mediante 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 efectúa la conjugación CDAP (documento WO 95/08348). Para estimular la inmunogenicidad, los polisacáridos pueden adyuvarse y/o liofilizarse. Los polisacáridos de la invención pueden ser de tamaño completo o reducirse su tamaño después de la purificación a polisacáridos u oligosacáridos más pequeños.

En otro aspecto de la invención, la citolisina, preferentemente neumolisina, puede combinarse con cualquiera de los polisacáridos u oligosacáridos descritos en lo que antecede, sin conjugarse la citolisina al polisacárido u oligosacárido para formar una composición inmunogénica o vacuna.

El procedimiento de la invención comprende, preferentemente, otra etapa de formulación de citolisina, preferentemente neumolisina, en una vacuna.

El término “polisacárido” incluye la forma de longitud completa de los polisacáridos aislados del organismo y abarca polisacáridos, lipopolisacáridos y lipooligosacáridos capsulares. También abarca polisacáridos y oligosacáridos de tamaño ajustado.

En la presente memoria descriptiva, con los términos “que comprende”, “comprenden” y “comprende” los inventores pretenden que sean opcionalmente sustituibles con los términos “que están compuestos por” “compuestos por” y “compuesto por”, respectivamente, en cada caso.

Proteínas y composiciones inmunogénicas

Además se describe la citolisina, preferentemente neumolisina, purificada mediante el procedimiento de la invención. Esto incluye un conjugado de neumolisina-polisacárido capsular bacteriano hecho mediante el procedimiento de la invención.

Además se describe una composición inmunogénica que comprende citolisina, preferentemente neumolisina o neumolisina-polisacárido capsular bacteriano obtenidos mediante el procedimiento de la invención (como se ha descrito en lo que antecede).

La composición inmunogénica, preferentemente comprende además uno o más miembros de la familia de las proteínas neumocócicas de unión a colina, preferentemente la proteína A de unión a colina o un fragmento inmunogénico de la misma y/o uno o más miembros de la familia de la tríada de polihistidina (incluidas sus proteínas de fusión), preferentemente PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, o un fragmento inmunogénico de los mismos.

Concerniente a la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), los miembros de esta familia se identificaron originariamente como proteínas neumocócicas que podrían purificarse mediante cromatografía de afinidad por colina. Todas las proteínas de unión a colina están unidas de un modo no covalente a restos de fosforilcolina del ácido teicoico de la pared celular y del ácido lipoteicoico asociado a la membrana. Estructuralmente, tienen varias regiones en común con la familia entera, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión a colina comprenden una región N terminal (N), regiones de repeticiones conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión a colina conservada (C), formada por múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se usa en esta solicitud, el término “Familia de proteínas de unión a colina (CbpX)” se selecciona del grupo compuesto por las proteínas de unión a colina como se identifican en el documento WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD y CbpG. La CbpA se describe en el documento WO97/41151. CbpD y CbpG se describen en el documento WO00/29434. PspC se describe en el documento WO97/09994. PbcA describe en el documento WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a colina descrita en el documento WO98/39450. Preferentemente, las proteínas de unión a colina se seleccionan del grupo compuesto por CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Además se describen fragmentos de CbpX en los que “CbpX” se ha definido en lo que antecede y “fragmentos” se refiere a proteínas CbpX que crecen del 50% o más de la región de unión a colina (C). Preferentemente, tales proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Más preferentemente, tales fragmentos proteicos carecen de (i) la región

de unión a colina e (ii) también una porción de la mitad N terminal de la proteína, aunque conservan al menos una región de repetición (R1 o R2), Todavía más preferentemente, el fragmento tiene 2 regiones de repetición (R1 y R2), más preferentemente el fragmento conserva la región rica en prolina (P). Ejemplos de tales fragmentos son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en los documentos WO99/51266 o WO99/51188 y NR1xR2P, no obstante, dentro del alcance de esta invención también se contemplan otras proteínas de unión a colina que carecen de una región similar de unión a colina.

La familia LytX consta de proteínas asociadas a la membrana relacionadas con la lisis celular. EL dominio en el extremo N comprende dominio(s) de unión a colina, no obstante, la familia LytX no posee todas las características encontradas en la familia CbpA indicadas anteriormente y, por tanto, la familia LytX se considera distinta a la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio del extremo C contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas Lytx. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia Lytx, LytA se describe en Ronda y col., Eur J Biochem, 164: 621-624 (1987). LytB se describe en el documento WO98/18930 y también se denomina Sp46. LytC también se describe en el documento WO98/18930 y también se denomina Sp91. Un miembro preferido de dicha familia es LytC.

Además se describen fragmentos de LytX en los que "LytX" se define como en lo que antecede y "fragmentos" se refiere a proteínas LytX que carecen del 50% o más de la región de unión a colina. Preferentemente, tales proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Un ejemplo de tales fragmentos se puede encontrar en la sección Ejemplos de esta invención.

Además se describen las proteínas quiméricas (o de fusión) fragmento de CbpX-fragmento de Lytx. Preferentemente, esto comprende NR1XR2 (o R1XR2 o NR1XR2P) de CbpX y la porción del extremo C (Cterm, es decir, que carece de los dominios de unión a colina) de LytX (p. ej., LytCCterm o Sp91 Cterm). Más preferentemente, CbpX se selecciona de grupo compuesto por CbpA, PbcA, SpsA y PSpC. Todavía más preferentemente es CbpA. Preferentemente, LytX es LytC (también denominada Sp91).

Además se describe PspA o PsaA, o fragmentos que carecen del dominio de unión a colina (C) expresados opcionalmente como una proteína de fusión con Lytx. Preferentemente, LytX es LytC.

La familia de Pht (Tríada de polihistidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lapidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente implicados en la unión a metal o a nucleósidos o la actividad enzimática, regiones superhélice (3-5), un extremo N conservado y un extremo C heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos analizadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros estreptococos y Neisseria. Miembros preferidos de la familia comprende PhtA, PhtB y PhtD. Más preferentemente, comprende PhtA o PhtD. No obstante, cabe entender que los términos PhtA, B, D y E se refieren a proteínas de las que se han descrito sus secuencias en las citas que figuran a continuación, así como variantes naturales (y fabricadas por el ser humano) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es al menos un 90% idéntica a las proteínas referenciadas. Preferentemente es al menos un 95% idénticas y, más preferentemente, un 97% idénticas.

La composición inmunogénica puede incorporar proteínas de fusión de proteínas de tríada de histidina. Estas incluyen proteínas de fusión con una proteína de tríada de histidina o un fragmento de la misma unida a una segunda proteína de la tríada de histidina o un fragmento de la misma. Proteínas de fusión preferidas contienen i) PhtD o un fragmento de la misma unida a PhtE o a un fragmento de la misma, o ii) PhtB o un fragmento de la misma unida a PhtE o un fragmento de la misma.

Con respecto a las proteínas PhtX, la PhtA se describe en el documento WO 98/18930, y también se denomina Sp36. Como se ha indicado en lo que antecede, es una proteína de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II de LXXC.

La PhtD se describe en el documento WO 00/37105 y también se denomina Sp036D. Como se ha indicado antes, también es una proteína de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II LXXC. La PhtB se describe en el documento WO00/37105 y también se denomina Sp036B. Otro miembro de la familia de PhtB es el polipéptido de degradación C3, como se describe en el documento WO00/17370. Esta proteína también es de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II LXXC. Un equivalente preferido inmunológicamente funcional es la proteína Sp42 descrita en el documento EO 98/18930. Un fragmento de PhtB (de aproximadamente (79 kD) se describe en el documento WO99/1567, que también se considera un miembro de la familia de PhtX.

PhtE se describe en el documento WO00/30299 y se denomina BVH-3.

Con el fin de generar una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra más de un patógeno implicado en la otoño media, es ventajoso para las composiciones inmunogénicas de la invención comprender además un antígeno de uno o más (2, 3, 4, 5, 6) de *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* no tipificable, *Moraxella catarrhalis*, VRS, virus de la parainfluenza y/o virus de la gripe.

La presente invención también describe vacunas de combinación que proporciona protección contra un abanico de patógenos diferentes. En la actualidad, muchas vacunas pediátricas se administran como una vacuna de combinación

de modo que reducen el número de inyecciones que ha de recibir un niño. Por ejemplo, las vacunas de la invención se pueden formular (o administrar por separado pero al mismo tiempo) con la vacuna de combinación “trivalente” bien conocida que comprende el toxoide diftérico (TD), el toxoide del tétanos (TT) y componentes de pertussis [toxoide de pertussis normalmente destoxificado (TP) y hemaglutinina filamentosa (FHA) con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinina 1+2], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biologicals) que contiene antígenos de TD, TT, TO, FHA y PRN, o con un componente pertussis de célula entera, por ejemplo como ha comercializado SmithKlineBeecham Biologicals S.A. como Tritanrix™. La vacuna combinada puede también comprender otro antígeno, como el antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg), antígenos del virus de la polio (por ejemplo, virus trivalente inactivado de la polio-VPI), proteínas de membrana externa de *Moraxella catarrhalis*, proteínas no tipificables de *Haemophilus influenzae*, proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis* B.

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 el documento WO96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y/o LbpB [documento WO98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documento WO 97/13785 y documento WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 9917977.2); lipo10 (documento GB 9918208.1); lipo11 (documento GB 9918302.2); lipo 18 (documento GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpLA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); y OmpE. 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 fimbrina [(documento US 5766608- Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de los mismos [p. ej., fusiones de péptidos LB1 (f); documento US 5843464 (OSU) o documento WO99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University de Nueva York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); proteína D (documento EP 594610); P2; y P5 (documento 94/26304).

Otras combinaciones contempladas en la citolisina, preferentemente neumolisina, de la invención en combinación con antígenos virales, por ejemplo virus de la gripe (atenuado, dividido o subunidad [p. ej., neuraminidasa glicoproteica de superficie (NA) y hemaglutinina (HA). Véase, por ejemplo, Chaloupka 1 y col., Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15: 121-127], VRS (p. ej., antígenos F y G o fusiones F7G, véase, por ejemplo, Schmidt A.C. y col., J Virol, mayo 2001, pág. 4594-4603), virus de la parainfluenza 3 (VPI3) (p. ej., proteínas HN y F, véase Schmidt y col, ant.), virus de la varicela (p. ej., atenuado, glucoproteínas I-V etc.), y cualquiera (o todos) los componentes de la vacuna triple vírica (sarampión, paperas, rubéola).

Vacunas

Además se describe una vacuna que comprende citolisina, preferentemente neumolisina o un conjugado de neumolisina-polisacárido capsular bacteriano, obtenida mediante el procedimiento de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante.

Una vacuna puede comprender las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas son capaces de generar una respuesta inmunológica protectora contra la infección por *S. pneumoniae* y/o la otitis media.

Otra forma de realización de la invención incluye un procedimiento de preparar una vacuna tomando una citolisina, preferentemente neumolisina, hecha mediante el procedimiento de la invención y formulándola como una vacuna con un excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, con uno o más de los otros antígenos descritos en lo que antecede.

Además se describe un procedimiento de tratamiento o prevención de infección bacteriana, preferentemente de infección por *Streptococcus pneumoniae* o de otitis media, que comprende la administración de la vacuna o la composición inmunogénica.

Además se describe el uso de la citolisina, preferentemente neumolisina y/o conjugado neumolisina-polisacárido capsular bacteriano, cualquiera de los cuales se obtiene mediante un procedimiento de la invención, en la preparación de una vacuna para el tratamiento o prevención de la infección bacteriana, preferentemente infección por *Streptococcus pneumoniae* u otitis media.

Preferentemente, las vacunas están adyuvadas. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alúmina) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, de magnesio, de hierro o de cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivados catiónica o aniónicamente, o polifosfacenos.

Se prefiere que el adyuvante se seleccione de modo que sea un inductor preferencial de un tipo de respuesta TH1. Tales niveles elevados de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno dado, mientras que los niveles elevados de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunitarias humores al antígeno.

Es importante recordar que la distinción entre respuesta inmunitaria de tipo Th1 y de tipo Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente de tipo Th1 o predominantemente de tipo Th2. No obstante, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos del descrito en clones de células T CD4+ve murinas por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 y TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, pág. 145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se asocian con la producción de las citocinas INF- γ E IL-2 por parte de los linfocitos T. Otras citocinas a menudo directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunitarias de tipo Th1 no son producidas por las células T, tal como la IL-12. En contraste con ello, las respuestas de tipo Th2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Entre los sistemas adyuvantes adecuados que estimulan una respuesta predominantemente de tipo Th1 se incluyen: Monofosforilo lípido A o un derivado del mismo, particularmente monofosforilo lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación véase el documento GB 2220211A); y una combinación de monofosforilo lípido A, preferentemente el monofosforilo lípido A 3-des-O-acilado, junto con una sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En tales combinaciones, el antígeno y el 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, lo que permite una administración más eficaz de las señales antigénicas e inmunoestimuladoras. En los estudios se ha demostrado que el 3D-MPL puede potenciar más la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en alúmina [Thoelen y col. Vaccine (1998) 16: 708-14; documento EP 689454-B1].

Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforilo lípido A 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 en la que el QS21 se inactiva con colesterol tal y como se describe en el documento WO96/33739.

Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO95/17210, y es una formulación preferida.

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

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

Oligonucleótidos no metilados que contienen CpG (documento WO 96/02555) también son inductores preferentes de una respuesta de tipo Th1 y son adecuados para usar en la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención se describe una vacuna como se describe en la presente memoria descriptiva para usar en medicina. Se describe un procedimiento de prevención o mejora de la neumonía en un ser humano anciano (de alrededor de 55 años de edad), que comprende administrar a dicho paciente anciano una cantidad segura y eficaz de una vacuna de la invención, y, opcionalmente, un adyuvante de Th1.

En otra forma de realización se describe un procedimiento de prevención y mejora de la otitis media en lactantes (de hasta 24 meses de edad) o niños pequeños (normalmente de 24 meses a 4 años), que comprende a dicho lactante o niño pequeño una cantidad segura y eficaz de una vacuna que comprende una citolisina, preferentemente neumolisina, opcionalmente con uno o más de los otros antígenos descritos anteriormente y, opcionalmente, un adyuvante de Th1.

Las preparaciones de la vacuna pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero (preferentemente un paciente humano) susceptible a la infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de una vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección *a través de* las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o *mediante* administración mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de las vacunas para el tratamiento de la neumonía o la otitis media (como portador nasofaríngeo de neumococos puede evitarse con más eficacia, lo que atenúa la infección en su etapa más precoz). Aunque la vacuna puede administrarse en forma de una dosis única, los componentes de la misma también pueden co-administrarse juntos al mismo tiempo o a tiempos diferentes (por ejemplo, si en una vacuna hay polisacáridos, estos podrían administrarse por separado al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de la combinación de proteínas bacterianas para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias en relación de una con otra). Además de una única vía de administración se pueden usar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, los antígenos virales pueden administrarse ID (intradérmica), mientras que las proteínas bacterianas pueden administrarse IM (intramuscular) o IN (intranasal). Si hay polisacáridos presente, pueden administrarse IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse IN (o ID). Además, las vacunas pueden administrarse IM para las dosis primarias e IN para las dosis de refuerzo.

La cantidad de antígeno conjugado en cada vacuna, la dosis se selecciona en forma de una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin significativos efectos secundarios en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplea y cómo se presenta. El contenido de antígenos proteicos en la vacuna

normalmente estará en el intervalo de 1-100 μg , preferentemente de 5-50 μg , más normalmente en el intervalo de 5-25 μg . Si hay polisacáridos incluidos, generalmente se espera que cada dosis comprenda 0,1-100 μg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 μg , más preferentemente 0,1-10 μg , de los cuales el intervalo más preferible es de 1 a 5 μg .

5 Las cantidades óptimas de los componentes para una vacuna concreta se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas. Normalmente, una vacuna comprenderá antígeno (proteínas), un adyuvante y excipientes o un portador farmacéuticamente aceptable.

10 La preparación de vacunas se describe en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M.F. Y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). Fullerton, patente de EE.UU. 4.235.877 describen encapsulación dentro de liposomas.

15 Aunque las vacunas pueden administrarse por cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una forma de realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "callosa" externa denominada el estrato córneo, que está encima de la epidermis. Bajo esta epidermis existe una capa denominada dermis, que a su vez está encima del tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular en la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, que también puede estar asociada con una serie de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en la presente memoria
20 descriptiva forma una característica preferida.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento mantoux", comprende la etapas de limpiar la pie y, después, extender con una mano y, con el bisel de una aguja de diámetro estrecho (0,46-0,29 mm) hacia arriba, la aguja se inserta en un ángulo de entre 10-15°. Una vez que el bisel de la aguja se inserta, el cuerpo de la aguja se
25 baja y se hace avanzar más al tiempo que se efectúa una ligera presión para elevarla bajo la piel. A continuación se inyecta el líquido muy despacio, de modo que se forma una ampolla o bulto en la superficie de la piel, seguido por la lenta retirada de la aguja.

Más recientemente se han descrito dispositivos específicamente diseñados para administrar agentes líquidos en
30 o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección en chorro descritos, por ejemplo, en los documentos WO01/13977; US 5.480-381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Procedimientos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos
35 diseñados para la administración balística de vacunas sólidas (documento WO 99/27961) o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicados a la superficie de la piel (administración transdérmica o transcutánea WO 98/20734; WO 98/28037).

40 Cuando las vacunas han de administrarse en la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen de líquido bajo, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

El contenido de los antígenos en las vacunas cutáneas o intradérmicas puede ser similar a las dosis convencio-
nales encontradas en las vacunas intramusculares. En consecuencia, los antígenos proteicos presentes en las vacunas
45 intradérmicas pueden estar en el intervalo de 1-100 μg , preferentemente de 5-50 μg . Asimismo, si está presente, se espera que la cantidad de antígeno conjugado con polisacárido en cada dosis de vacuna comprenda de 0,1-100 μg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 μg , preferentemente 0,1-10 μg , y puede estar entre 1 y 5 μg . No obstante, es una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas que las formulaciones pueden ser de "dosis baja". En consecuencia, los antígenos proteicos en las vacunas de "dosis baja" están presentes, preferentemente, en tan poco
50 como 0,1 a 10 μg , preferentemente de 0,1 a 5 μg por dosis; y, si están presentes, los antígenos conjugados con polisacárido pueden estar presentes en el intervalo de 0,01-1 μg y, preferentemente, entre 0,01 a 0,5 μg de polisacárido por dosis.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "administración intradérmica" significa administración
55 de la vacuna en la región de la dermis en la piel. No obstante, la vacuna no se localizará necesariamente exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa de la piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie de la piel humana, pero existe cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis dirigiéndose 1,5 mm debajo de la superficie de la piel. La dermis se
60 localiza entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea inferior. Dependiendo del modo de administración, la vacuna puede localizarse, en última instancia, únicamente o principalmente dentro de la dermis, o puede distribuirse, en última instancia, dentro de la epidermis y la dermis.

Las composiciones y vacunas inmunogénicas se pueden evaluar en varios modelos animales o con suero humano. Como ilustración se pueden usar los modelos animales siguientes para evaluar la infección neumocócica. Ratones
65 C3H/HeJ (de 6 a 8 semanas de edad) se pueden inmunizar s.c. con 15 μg de proteína adyuvada con 50 μl de CFA, seguido 3-4 semanas más tarde por refuerzo con 15 μg de proteína con IFA. Para demostrar la protección activa y pasiva frente a la infección sistémica, se puede administrar a los ratones por vía intraperitoneal suero inmune o proteínas antes de la exposición mediante inyección intraperitoneal de 15 a 90 DL50 de neumococos la semana 8-

10. Además, las proteínas se pueden analizar en un modelo de colonización de nasofaringe de ratón de (Wu y col. Microbial Pathogenesis 1997; 23: 127-137)

Además de los ratones, las ratas lactantes son susceptibles a la colonización e infección por *S. pneumoniae*. En estudios de protección pasiva, la administración de suero inmune de ratón (100 μ l i.p. o 10 μ l i.n.) se puede realizar antes de la exposición con administración intranasal de *S. pneumoniae* (10 μ l) en cachorros de rata lactante de 2-5 días de edad. La colonización se puede determinar sembrando en placas lavados nasales (20-40 μ l instilados, 10 μ l extraídos).

Se pueden demostrar las interacciones favorables entre los componentes proteicos (o la proteína y el polisacárido) de la vacuna de combinación mediante la administración de una dosis de cada proteína (o proteína y polisacárido) en la vacuna que sería sub-protectora en una vacuna monovalente. La mayor eficacia protectora de la vacuna de combinación en comparación con las vacunas monovalentes se puede atribuir a una interacción favorable entre los componentes.

La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que son bien conocidos y rutinarios para los expertos en la técnica, a excepción de cuando se describa de otro modo con detalle. Los ejemplos están destinados a ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Purificación de neumolisina

La neumolisina se expresó de forma recombinante en un cultivo de *E. coli*. Tras 18 horas de inducción del cultivo de *E. coli* incrementando la temperatura a 39,5°C, la *E. coli* se sedimentó mediante centrifugación a 17.000 g durante 1 hora. El sedimento se resuspendió en dietanolamina 25 mM a pH 9,0 y *E. coli* se fragmentó mecánicamente usando un pase a 3447,379 kPa en un aparato de Rannie. A la *E. coli* fragmentada se añadió sarcosinato de lauroilo sódico (SLS) al 1% y la mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la centrifugación a 30.000 g durante 20 minutos de modo que se sedimentó el residuo celular. El sobrenadante se diluyó 2,5 veces para finalizar en fosfato 20 mM a pH 7,0 con NaCl 1M y SLS al 1%, y después se cargó en una columna HP de fenil-sefarosa equilibrada en el mismo tampón (fosfato 20 mM a pH 7,0 con NaCl 1M y SLS al 1%= tampón de equilibrio). La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón de equilibrio, seguido por 2 volúmenes de columna de tampón fosfato 20 mM a pH 7,0, con NaCl 0,5M y SLS al 1%. La neumolisina eluyó de la columna aplicando un tampón de bajos niveles de sales que contienen tampón fosfato 20 mM a pH 7,0 con SLS al 1%. Las fracciones que contienen neumolisina se identificaron usando análisis de SDS-PAGE, se agruparon y el tampón se intercambió a dietanolamina 25 mM a pH 9,0 usando diafiltración.

La neumolisina se solubilizó mediante desnaturalización añadiendo clorhidrato de guanidina hasta una concentración final 6M e incubando durante una hora. Después se sometió a diafiltración frente a urea 8M en dietanolamina 25 mM a pH 9,0 que contiene DTT 1 mM. La neumolisina se volvió a plegar mediante diafiltración frente a tampón borato 20 mM a pH 9,0 con DTT 1 mM. Después de la renaturalización, la DTT se eliminó mediante diafiltración frente a tampón borato 20 mM a pH 9,0.

La pureza alcanzada de la neumolisina se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie. Un gel distinto se analizó mediante Western blot usando un anticuerpo contra *E. coli* para detectar el nivel de proteínas de *E. coli* que permanecen en la preparación de neumolisina purificada. La actividad biológica de la neumolisina purificada se evaluó usando un ensayo de hemólisis *in vitro*.

Resultados

Como se muestra en la figura 1, el procedimiento descrito antes pudo producir una purificación altamente eficaz de neumolisina tras una única etapa de cromatografía. El gel teñido con azul de Coomassie en el panel A muestra que la elución de la columna con un tampón con bajos niveles de sales que no contiene cloruro sódico añadido pudo eluir una banda de 53 kDa correspondiente a la neumolisina de la columna en forma altamente purificada. También se piensa que la banda mucho más débil de aproximadamente 45 kDa es neumolisina, ya que esta segunda banda se une a anticuerpos antineumolisina (resultados no mostrados) y no se une a los anticuerpos anti *E. coli*, como se muestra en el panel B. El Western blot del panel B es un procedimiento altamente sensible de detectar cualquier proteína contaminante que permanezca en la neumolisina purificada. Este procedimiento fue capaz de detectar muy pocos contaminantes y los presentes lo estaban a un nivel bajo inferior al nivel de detección de la tinción de Coomassie. Por tanto, la neumolisina se purificó hasta un nivel de pureza del 98-100%.

El rendimiento del procedimiento de purificación fue bueno, en el que un ciclo típico dio alrededor de 1900 mg de neumolisina por litro de fermentación. Aproximadamente el 10% de la proteína del cultivo de fermentación se recuperó en forma de neumolisina purificada.

La actividad de la neumolisina en un ensayo de hemólisis se evaluó después de haber tratado la neumolisina con clorhidrato de guanidinio/urea y de haberse plegado de nuevo mediante la eliminación del desnaturalizante. La actividad hemolítica se detectó en diluciones de la neumolisina purificada hasta concentraciones de 1,3 ng/ml que mostraron que la actividad hemolítica se había restablecido. Esto corresponde a entre 500.000 y 1.000.000 unidades hemolíticas por mg de neumolisina de tipo salvaje.

Ejemplo 2

Purificación de neumolisina con omisión de centrifugación

La neumolisina se expresó de forma recombinante en un cultivo de *E. coli*. Tras 18 horas de inducción del cultivo de *E. coli* incrementando la temperatura a 39,5°C, el cultivo se enfrió hasta 20°C y al cultivo se añadió sarcosinato de lauroilo sódico (SLS) hasta una concentración final del 1%. El cultivo se incubó en presencia de SLS durante 30 minutos. Se añadió dietanolamina (DEA) al cultivo para dar una concentración final de 25 mM y a un pH de 9. El cultivo se rompió mecánicamente usando cuatro pases a 6.700 kPa en un aparato de Rannie. El cultivo se diluyó hasta DO600 equivalente de 60 y se pre-filtró pasando a través de un filtro de 0,65 µm de espesor (por ejemplo un filtro de Millistock COHC). El cultivo filtrado se diluyó 2 veces en un tampón que contenía SLS al 1%, NaCl 2M y que tiene un pH de 7,0. El cultivo filtrado se cargó en una columna HP de fenil-sefarosa (Amersham) equilibrada en fosfato 20 mM a pH 7,0 que contenía NaCl 1M y SLS al 1% (Tampón de equilibrio). La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón de equilibrio, seguidos por 2 volúmenes de columna de tampón fosfato 20 mM a pH 7,0 que contenía NaCl 0,5M y SLS al 1%. La neumolisina eluyó de la columna aplicando un tampón con niveles bajos de sales (sin NaCl) que contenía tampón fosfato 20 mM a pH 7,0 que contenía SLS al 1%. Una única etapa de columna pudo producir neumolisina de una pureza de al menos un 90%. Cuando se requieren niveles elevados de pureza, la neumolisina se puede pasar a través de una columna de filtración en gel. Las fracciones que contenían neumolisina se identificaron usando análisis SDS-PAGE, se agruparon y el tampón se intercambió a dietanolamina 25 mM a pH 9,0 usando diafiltración.

La neumolisina se solubilizó mediante desnaturalización añadiendo clorhidrato de guanidina sólido hasta una concentración final de 6M e incubando durante una hora. Se diafiltró frente a urea 8M en dietanolamina 25 mM a pH 9,0 que contenía DTT 1 mM. La neumolisina se volvió a plegar mediante diafiltración frente a tampón borato 20 mM a pH 9,0 con DTT 1 mM. La última diafiltración se llevó a cabo con un caudal de 100 ml/min durante la primera hora, 200 ml/min durante la segunda hora, 300 ml/min durante la tercera hora y 400 ml/min durante otras 2-3 horas. Tras la renaturalización, DTT se eliminó mediante diafiltración frente a tampón borato 20 mM a pH 9,0. La neumolisina activa pura se almacenó a 4°C o congelada a -20°C o a una temperatura inferior.

La pureza de la neumolisina conseguida se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie. El rendimiento de neumolisina usando este procedimiento fue de aproximadamente 1000 mg/litro de fermentación. El análisis en una columna de filtración en gel HR400 mostró que el 90-95% de la neumolisina era monomérica. Un ensayo *in vitro* de hemólisis mostró que la actividad hemolítica se conservaba, lo que demostraba que se había conseguido el correcto replegamiento de la neumolisina.

Ejemplo 3

Destoxificación de la neumolisina de S. pneumoniae usando GMBS

La neumolisina purificada se destoxificó mediante modificación de los grupos sulfhidrilo y amino primarios usando el reactivo de reticulación de éster NHS-maleimida GMBS (éster N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida). La neumolisina a una concentración de 1 mg/ml se dializó frente a tampón borato 50 mM a pH 9,0. El GMBS se disolvió inicialmente en DMSO y se añadió a la neumolisina en un exceso molar de 248 veces de GMBS. El tratamiento continuó durante una hora a temperatura ambiente. EL exceso de GMBS y de los subproductos se eliminó mediante diálisis frente a fosfato sódico 100 mM a pH 6,8. Los demás grupos de maleimida se inactivaron mediante la reacción con 0,6 mg/ml de cisteína durante dos horas a temperatura ambiente. Con el fin de eliminar el exceso de cisteína, la muestra se dializó frente a fosfato sódico 2 mM a pH 7,15.

Ejemplo 4

Destoxificación de la neumolisina de S. pneumoniae usando GMBS

La neumolisina purificada se destoxificó mediante modificación de los grupos sulfhidrilo y de amino primarios usando el reactivo de reticulación de éster NHS-maleimida GMBS (éster N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida). La neumolisina a una concentración de 0,5 mg/ml se introdujo en un tampón de pH 7,5 mediante la adición de KH₂PO₄ y se añadió NaCl hasta 250 mM. El GMBS se disolvió inicialmente en DMSO y se añadió a la neumolisina en un exceso molar de 248 veces de GMBS. El tratamiento continuó durante una hora a temperatura ambiente. El exceso de GMBS y de los subproductos se eliminó mediante diafiltración usando una membrana de 30 kD frente a fosfato sódico 2 mM a pH 7,15. A continuación se ajustó el pH a 6,8 mediante la adición de NaH₂PO₄. Los demás grupos de maleimida se inactivaron mediante la reacción con 0,6 mg/ml de cisteína durante dos horas a temperatura ambiente. Con el fin de eliminar el exceso de cisteína, la muestra se diafiltró frente a fosfato sódico 2 mM a pH 7,15 y se concentró hasta 1 mg/ml.

Ejemplo 5

Destoxificación de la neumolisina de S. pneumoniae usando GMBS

- 5 La neumolisina se dializó en primer lugar frente a tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 7,2. El reactivo de reticulación heterobifuncional GMBS (éster N-(γ -maleimidobutirilo) succinimida, Pierce) se disolvió en DMSO a 10 mg/ml. A 1 ml de neumolisina (1 mg/ml) se añadió una alícuota igual a la cantidad seleccionada de GMBS. Tras 60 minutos a temperatura ambiente, la neumolisina activada se purificó bien en una columna PD10 (Amersham) bien mediante filtración en gel (Toy-o-pearl HW-40, XK 16/40, elución con tampón de fosfato sódico 100 mM a pH 6,8) o bien mediante diálisis con el fin de eliminar el exceso de reactivo y de subproductos de GMBS. El grado de derivación de la PLY se midió mediante estimación de las funciones de maleimida usando la prueba de Ellman (Aitken y Leurmonth, pág. 487-488. The protein protocols handbook Ed: J.M. Walter (1996)). Las funciones de maleimida se inactivaron mediante una solución de cisteína como etapa final del procedimiento de destoxificación (cisteína a 4 mg/ml (Merck), incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente). Con el fin de eliminar el exceso de cisteína, la muestra se dializó frente a tampón de fosfato sódico 100 mM a pH 6,8. A continuación, la muestra se filtra a través de una membrana de esterilización de 0,22 μ m.

Ejemplo 6

20 *Caracterización de la neumolisina destoxificada**Actividad hemolítica*

- 25 Para evaluar la toxicidad restante de la neumolisina destoxificada se usó un ensayo hemolítico. Diluciones de neumolisina seriadas al doble se incubaron con hematíes de carnero. Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a inmunoplaquetas y se midió la hemoglobina liberada usando lectura de densidad óptica a 405 nm. Los resultados se expresaron en forma de ng/ml de neumolisina correspondiente al punto medio de la curva de DO. El ensayo se repitió tras incubar la neumolisina destoxificada a 37°C durante 7 días para monitorizar la reversibilidad de destoxificación.

- 30 Como se muestra en la tabla 1, el tratamiento con GMBS pudo reducir sustancialmente la actividad hemolítica de PLY y se consiguió una reducción de hasta 3.000 veces de la actividad hemolítica. Proporciones molares de GMBS/lisina superiores pudieron producir mejor eliminación de la actividad hemolítica, siendo óptimas en este experimento las proporciones de 4/1 y 5/1. Se estimó que este tratamiento resultaba en la modificación de aproximadamente 14 residuos de lisina. Cuando se modificaron menos residuos de lisina, la reducción de la actividad hemolítica fue menor.

ELISA

- 40 La antigenicidad de la neumolisina destoxificada se evaluó mediante ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con un anticuerpo anti-neumolisina de cobaya. Las muestras que contenían las diluciones de neumolisina se incubaron en las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, la neumolisina unida se detectó usando anticuerpos policlonales de conejo contra neumolisina, conjugada con peroxidasa de rábano. Después de lavar las placas se usó una reacción del sustrato para evaluar la cantidad de neumolisina unida en cada pocillo.

- 45 Como se muestra en la tabla 1, el tratamiento con GMBS condujo a alguna pérdida de antigenicidad, como se evalúa mediante ELISA. No obstante se pudieron obtener lecturas de ELISA de aproximadamente el 66% de las proporcionadas por la PLY sin tratar, lo que muestra que muchos anticuerpos todavía podían reconocer la neumolisina modificada.

50 *Análisis SDS-PAGE*

- Las proteínas de neumolisina destoxificada se sometieron a SDS-PAGE (Novex 4-20% gel de poli(acrilamida) Invitrogen) y se usó azul brillante de Coomassie para visualizar las proteínas. Como se muestra en la figura 2, el tratamiento con GMBS condujo a un ligero incremento del peso molecular de la PLY de 53 kDa hasta aproximadamente 56 kDa. Este incremento se debe a la modificación de múltiples residuos de aminoácidos con GMBS. Un pequeño porcentaje de PLY se convierte en formas multiméricas, como se observa por la aparición de bandas débiles de peso molecular de aproximadamente 110 kDa y 170 kDa. No obstante, la mayor parte de la PLY permanece en una forma esencialmente monomérica. La incubación de la PLY a 37°C durante 7 días no tuvo como resultado ningún cambio sustancial en el aspecto de la PLY en un SDS-PAGE, lo que muestra que la PLY modificada no es objeto de degradación o de la posterior formación de multímero covalentemente unido.

65

ES 2 304 724 T3

TABLA 1

Ensayos de destoxificación de PLY mediante GMBS

Ensayo	Exceso de GMBS (GMBS/lisina)	Funciones de maleimida	Proporción ELISA/LOWRY %		Título hemolítico ng/ml	
			4°C	7D37°C	4°C	7D37°C
1	/	/	95	56	1,7	4,2
	1/1	8	63	87	186	111
	1,5/1	8,5	69	/	48	/
	2/1	9,4	76	/	309	/
	3/1	11,8	56	/	530	/
	4/1	13,5	66	/	6308	/
	5/1	14,2	67	/	4284	/
2	4/1	13,8	26,2	24,8	NH	NH
	8/1	17,6	23,9	38,0	NH	NH
3	4/1	11,3	89	46	1598	6309
Los ensayos se realizaron en 1 mg de PLY (1 mg/ml) a excepción del último ensayo, para el que se trataron 3 mg (PLY a 0,68 mg/ml)						

Ejemplo 7

Evaluación de la reactogenicidad de la neumolisina destoxificada en ratas

Grupos de tres ratas OFA se inmunizaron una vez mediante inoculación intramuscular (tibialis) con solución salina, neumolisina o neumolisina destoxificada con GMBS. Tres días después de la inmunización se sacrificó a todas las ratas y se prepararon los músculos tibialis para el examen histológico. Los músculos tibialis se fijaron en formalina y se cortaron en láminas de 2 mm, que se deshidrataron y embebieron en parafina. Se cortaron secciones de 7 um y se tiñeron usando el método de Trichrome Masson, antes de su examen microscópico.

La reactogenicidad se evaluó usando cuatro criterios: degeneración/necrosis, inflamación del endomisio, hemorragia e inflamación de la aponeurosis. Para cada criterio histológico se atribuyó una puntuación a cada músculo de cada grupo y después se calculó una puntuación media de la lesión para cada grupo. Una puntuación de 0= normal, 1= mínimo, 2= leve, 3= moderado, 4= marcado y 5= grave.

Resultados

Se analizó la histología de las secciones. Las puntuaciones medias de la degeneración/necrosis, inflamación del endomisio, hemorragia e inflamación de la aponeurosis se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Inoculación	Degeneración/necrosis	Inflamación del endomisio	Hemorragia	Inflamación de la aponeurosis
NaCl	0	0,5	0	0
Ply	3,6	3,8	3,0	1,4
GMBS-Ply	0,6	1,3	1,3	0,4

Una comparación de las puntuaciones histológicas para la neumolisina nativa y destoxificada muestra que GMBS es un reactivo de reticulación particularmente eficaz para usar para la destoxificación de la neumolisina, lo que produce una gran disminución de la degeneración/necrosis, inflamación del endomisio, hemorragia e inflamación de la aponeurosis.

Ejemplo 8

Evaluación de la toxicidad de la neumolisina tratada con GMBS en ratones

Grupos de 20 ratones OF1 se expusieron por vía intranasal a neumolisina nativa o a neumolisina tratada con GMBS y los ratones se monitorizaron durante los siguientes 9 días.

Como se muestra en la Figura 3, la exposición a 2 μ g de neumolisina nativa condujo muy rápidamente a la muerte de todos los ratones en dicho grupo. La neumolisina produjo lesiones en el sistema respiratorio, que condujeron a dificultades respiratorias y a la muerte. En contraste con ello, la neumolisina tratada con GMBS presentó una toxicidad sustancialmente reducida y todos los ratones a los que se inoculaban 2 μ g, 5 μ g o 10 μ g de la neumolisina tratada con GMBS sobrevivieron a la exposición.

Ejemplo 9

Estudios de protección con neumolisina destoxificada

Grupos de 20 ratones OF1 se inmunizaron 3 veces por vía intramuscular los días 0, 14 y 28 con 5 μ g de neumolisina y 50 μ g de fosfato de aluminio y 5 μ g de MPL como adyuvante. Los ratones control se inmunizaron con adyuvante solo. La neumolisina era no tratada o se destoxificó usando el tratamiento con GMBS descrito antes.

El día 42, se administró a los ratones una exposición mortal por vía intranasal con 2 μ g de neumolisina nativa. Se monitorizó la supervivencia de los ratones durante los 9 días siguientes.

Resultados

El modelo de exposición mortal condujo a una mortalidad del 90% en los ratones control (Figura 4). La inmunización con neumolisina destoxificada con GMBS produjo una protección muy buena, en la que sólo el 5% de los ratones murieron durante los 9 días siguientes. Esto fue comparable a la protección conferida tras la inoculación de neumolisina nativa, tras la cual murió el 10% de los ratones.

Ejemplo 10

Evaluación de la neumolisina destoxificada en combinación con PhtD en un modelo de exposición mortal en ratones

Grupos de 20 ratones OF1 se inmunizaron por vía intramuscular con a) adyuvante solo o b) 1 μ g de PhtD y adyuvante o c) 1 μ g de PhtD y 5 μ g de neumolisina destoxificada con GMBS y adyuvante. El adyuvante usado estaba compuesto por 50 μ g de fosfato de aluminio y 5 μ g de MPL y las inmunizaciones tuvieron lugar el día 0 y el día 14. Los ratones se expusieron a una dosis intranasal mortal de $5 \cdot 10^5$ UFC de *S. pneumoniae* del serotipo 2, cepa D39, y la supervivencia se monitorizó durante los siguientes 10 días.

Resultados

Como se muestra en la Figura 5, la exposición a la cepa D39 condujo a una letalidad del 75% tras 10 días en los ratones control. La inmunización con PhtD solo no proporcionó una protección significativa y el 70% de los ratones en este grupo murió tras 10 días ($p=0,29$). La inmunización con PhtD junto con neumolisina destoxificada confirió una protección significativamente mejor, reduciéndose la letalidad al 50% ($p=0,04$).

Ejemplo 11

Destoxificación de neumolisina usando formaldehído

Una reserva de neumolisina purificada a una concentración de aproximadamente 0,4 mg/ml se llevó a fosfato potásico 25 mM, lisina 50 mM y formaldehído al 0,1% (p/v). El pH se ajustó a 7,0 y la mezcla se incubó durante 21 días a 40°C. El formaldehído no reaccionado, la lisina y los demás subproductos de bajo peso molecular se eliminaron mediante diafiltración frente a fosfato sódico 2 mM a pH 7,15.

Ejemplo 12

Conjugación de GMBS-neumolisina destoxificada

La neumolisina tratada con GMBS (± 3 mg/ml en tampón borato 20 mM) se diafiltró frente a tampón fosfato 2 mM a pH 6,8, NaCl 150 mM para alcanzar una concentración entre 15 y 20 mg/ml. La diafiltración se realizó en una membrana Centrimate (0,09 m², corte a 10 kDa).

La activación y el acoplamiento se llevaron a cabo a 25°C, PS19F de *S. pneumoniae* se diluyó a 9 mg/ml en NaCl 2M y el pH se ajustó a 6,0 mediante la adición de HCl 0,05N. A tiempo 0, una solución de tetrafluoroborato de cianodiaminopiridinio (CDAP) (100 mg/ml en acetónitrilo/agua para inyección; 50/50 (v/v) se añadió manualmente con el fin de obtener una proporción CDAP/PS19F de 1,5 (p/v). Tras 1,5 minutos, el pH se elevó a un pH de 9,0 mediante la adición de NaOH 0,1M. La neumolisina tratada con GMBS (15 mg/ml) se añadió después con el fin de obtener una proporción de dPLY/PS de 3. La solución se dejó durante 240 minutos bajo regulación de pH. La reacción se detuvo mediante la adición de glicina 2M (proporción Gly/PS ((p/p). La solución se dejó durante 30 minutos antes de la purificación en Sephacryl S400HR. El conjugado tiene una proporción de dPLY/PS de 2,62/1 (p/p).

También se usó un enfoque similar para conjugar la neumolisina tratada con GMBS a PS8, PS12F y PS22F. Los conjugados resultantes tienen, respectivamente, una proporción de dPLY/PS de 1,61, 1,45 y 1,36.

Ejemplo 13

Inmunogenicidad de polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* conjugados con neumolisina destoxificada por GMBS como proteína transportadora

Grupos de 40 ratones hembra Balb/c se inmunizaron por vía intramuscular los días 0, 14 y 28 con formulaciones de polisacárido tetravalente (PS) que contienen PS capsulares neumocócicos PS 8, 12F, 19F y 22F (dosis: 0,1 μ g/PS).

Dos formulaciones constituidas por PS sencillo o por PS conjugado con neumolisina destoxificada con GMBS se administraron a los ratones. Ambas formulaciones de vacuna se suplementaron con una emulsión de aceite en agua que contenía MPL y QS21.

Los niveles de IgG antiPS mediante ELISA y los títulos de opsonofagocitosis se midieron en los sueros recogidos el día 42 usando los ensayos de ELISA de opsonofagocitosis esencialmente como se ha descrito en el documento WO 02/22167. En el caso del ensayo de opsonofagocitosis, las muestras de suero se analizaron frente a los serotipos 8, 12F, 19F y 22F de *S. pneumoniae*. Para el ELISA, los pocillos se recubrieron con 10-40 μ g/ml del polisacárido capsular requerido.

Resultados

Se observó una fuerte mejora de la respuesta de IgG para todos los PS en ratones inmunizados con PS conjugado con neumolisina destoxificada con GMBS, en comparación con los ratones a los que se administró PS simple (figura 6). La actividad opsonofagocítica (OPA) de los anticuerpos anti-PS también se potenció (figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de una citolisina bacteriana que comprende las etapas de:

- a) crecimiento de un cultivo de células que expresan citolisina bacteriana;
- b) romper mecánicamente el cultivo de células para formar un extracto;
- c) prefiltrar el extracto;
- d) unir la citolisina bacteriana agregada soluble contenida en el extracto en presencia de detergente a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica en condiciones de niveles elevados de sales (preferentemente 0,6-2M);
- e) eluir la citolisina bacteriana en presencia de detergente en condiciones de niveles bajos de sales (preferentemente 0-0,2M).

2. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende las etapas de:

- f) eliminar el detergente de la citolisina bacteriana
- g) solubilizar la citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante;
- h) eliminar el desnaturalizante de la citolisina bacteriana.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la etapa b) se lleva a cabo en presencia de detergente.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el cultivo de células se incuba con detergente antes de la rotura mecánica del cultivo de células en una etapa de pre-incubación.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa de pre-incubación dura aproximadamente 10 minutos.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la etapa b) y/o c) se lleva a cabo a un pH de 8-10.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la etapa b) y/o c) se lleva a cabo a una concentración de sales de 0-0,1M.

9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el la prefiltración usa un tamaño de filtro ente 0,45 y 2,5 μm .

10. El procedimiento de las reivindicaciones 1-9, en el que el mismo detergente está presente en las etapas d) y e).

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el mismo detergente está presente en las etapas b), d) y e).

12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el detergente está presente en una concentración de entre 0,1 y 2% (p/v).

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que no hay una etapa de centrifugación.

14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material de la cromatografía de interacción hidrofóbica usada en la etapa d) contiene grupos aromáticos.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el material de cromatografía hidrofóbica es fenil-sefarosa.

16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el detergente presente en la solución usada en la etapa b), c), d) y/o la etapa e) es un detergente alifático.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el detergente alifático es un detergente que puede reducir el tamaño de los agregados de neumolisina para convertir en solubles los agregados de neumolisina.

18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el detergente es sarcosinato de lauroflo sódico.

ES 2 304 724 T3

19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las condiciones de niveles elevados de sales de la etapa d) contiene sales entre 0,6M y 2M.

5 20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución usada en la etapa d) y/o e) contiene una sal seleccionada del grupo compuesto por cloruro sódico, cloruro de magnesio, cloruro amónico, sulfato sódico, sulfato de magnesio, sulfato amónico, fosfato sódico, fosfato de magnesio, fosfato amónico.

10 21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa d) y/o la etapa e) se llevan a cabo a un pH de entre 6 y 8, preferentemente de aproximadamente 7.

22. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las condiciones usadas en la etapa e) contienen sal 0-0,1M.

15 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que las condiciones usadas en la etapa e) contienen sales 0-40 mM.

24. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa f) implica la eliminación del detergente mediante diafiltración o diálisis.

20 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que la diafiltración/diálisis es frente a tampón con niveles bajos de sales de pH 8-10, preferentemente a un pH de aproximadamente 9.

26. El procedimiento de las reivindicaciones 2-25, en el que la etapa g) implica desnaturalizar la citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante, y la etapa h) implica volver a plegar la citolisina bacteriana mediante eliminación gradual del desnaturalizante.

27. El procedimiento de las reivindicaciones 2-26, en el que el desnaturalizante usado en la etapa g) es clorhidrato de guanidina.

30 28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que se usa clorhidrato de guanidina 5-8M.

29. El procedimiento de las reivindicaciones 26-28, en el que la citolisina bacteriana se pone en contacto con urea 5-9M durante la etapa g).

35 30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que la etapa g) implica poner en contacto la citolisina bacteriana con clorhidrato de guanidina 5-8M, seguido por el intercambio de clorhidrato de guanidina por urea 5-9M.

31. El procedimiento de las reivindicaciones 26-30, en el que un agente reductor está presente durante al menos parte de las etapas g) y h).

40 32. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que el agente reductor es DTT 0,1-10 mM, preferentemente DTT a alrededor de 1 mM.

45 33. El procedimiento de la reivindicación 2-32, en el que en la etapa h) la citolisina bacteriana se vuelve a plegar de modo que su actividad hemolítica se restablece a un valor por encima del 50% del de la proteína plegada.

34. El procedimiento de la reivindicación 2-33, en el que la etapa h) implica la eliminación del desnaturalizante mediante diafiltración o diálisis.

50 35. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que en la etapa h) implica la eliminación del desnaturalizante de un modo lineal.

55 36. El procedimiento de la reivindicación 34 ó 35, en el que en la etapa h) implica la diafiltración a caudales progresivamente superiores.

37. El procedimiento de la reivindicación 34 ó 35, en el que en la etapa h) implica la diálisis frente a soluciones que contienen progresivamente menos desnaturalizante.

60 38. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 34-37, en el que la diafiltración o la diálisis se realiza contra una solución de pH 7-9.

39. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende otra etapa de destoxificación de la citolisina bacteriana mediante tratamiento químico.

65 40. El procedimiento de la reivindicación 39, en el que el tratamiento químico implica el uso de un agente de reticulación.

ES 2 304 724 T3

41. El procedimiento de la reivindicación 40, en el que el reactivo de reticulación contiene uno o más compuestos químicos seleccionados del grupo compuesto por: formaldehído, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimido y GMBS.

42. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa adicional de conjugación de la citolisina bacteriana a un polisacárido bacteriano.

43. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa adicional formulación de citolisina bacteriana en una composición de vacuna con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

44. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa adicional de formular la citolisina bacteriana con uno o más de: proteína A de unión a colina o un fragmento inmunogénico de la misma, o PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, o un fragmento inmunogénico de los mismos, o un antígeno de *Haemophilus influenzae* no tipificable (NtHi), o un antígeno de *Moraxella catarrhalis* o un antígeno del VSR, o un antígeno del virus de parainfluenza, o un antígeno del virus de la gripe.

45. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa adicional de formular la citolisina bacteriana con un adyuvante seleccionado de un grupo compuesto por: una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alúmina) o fosfato de aluminio, una sal de calcio, magnesio, hierro o cinc, una suspensión insoluble de azúcares acilados, polisacáridos derivados catiónica o aniómicamente, polifosfacenos, MPL o un derivado del mismo, 3D-MPL, saponina, QS21 y oligonucleótido no metilado que contiene CpG.

Figura 1

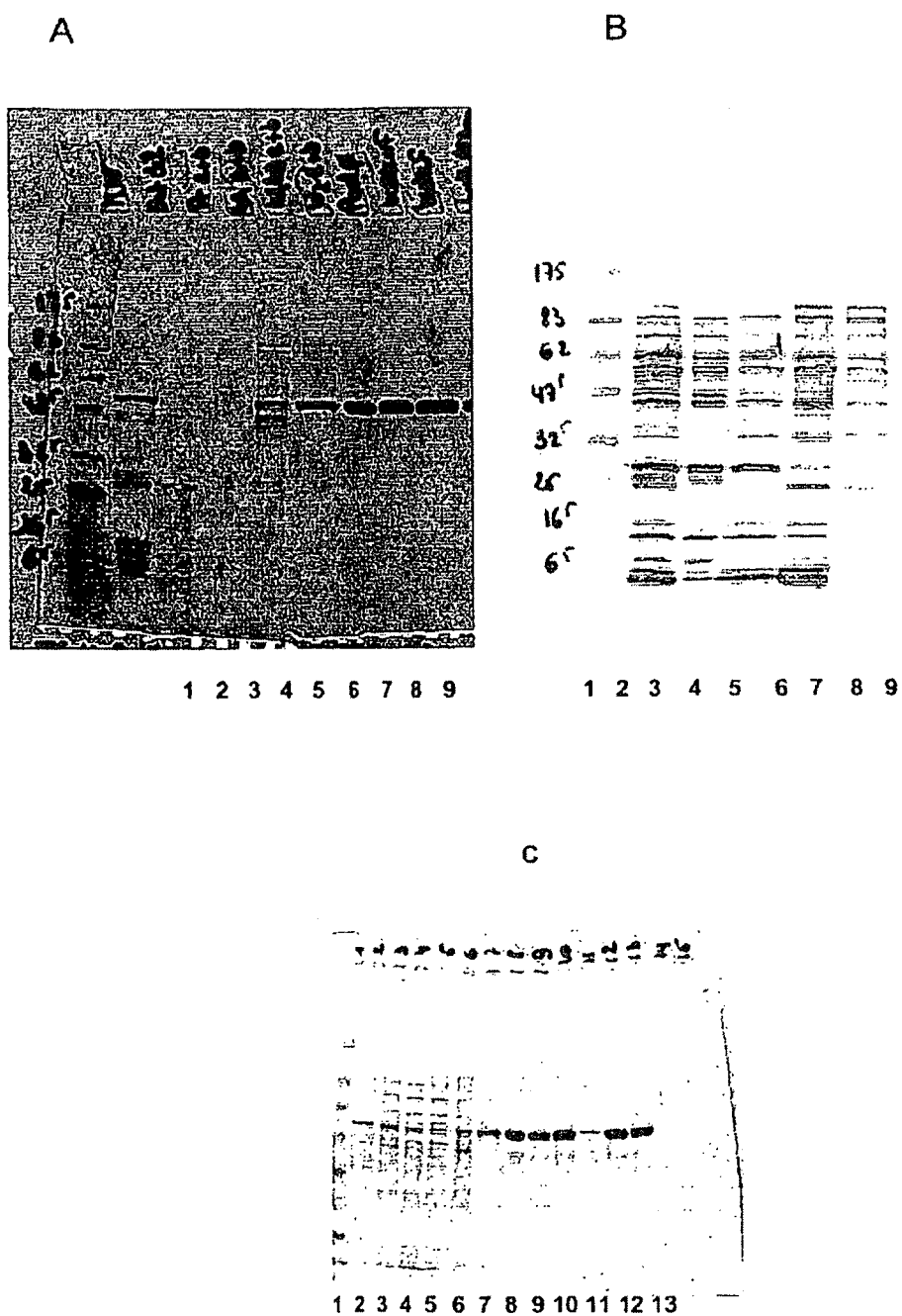


Figura 2

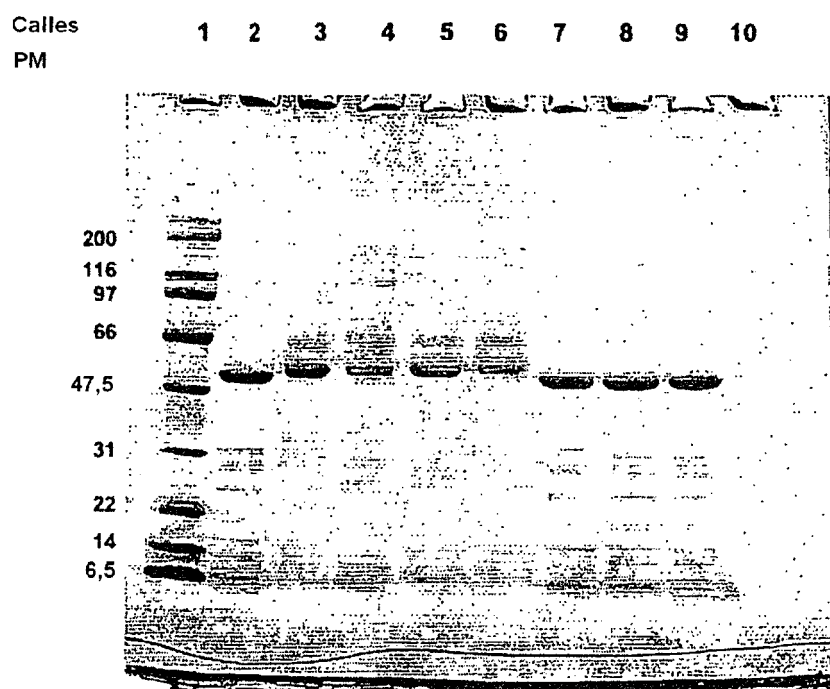


Figura 3

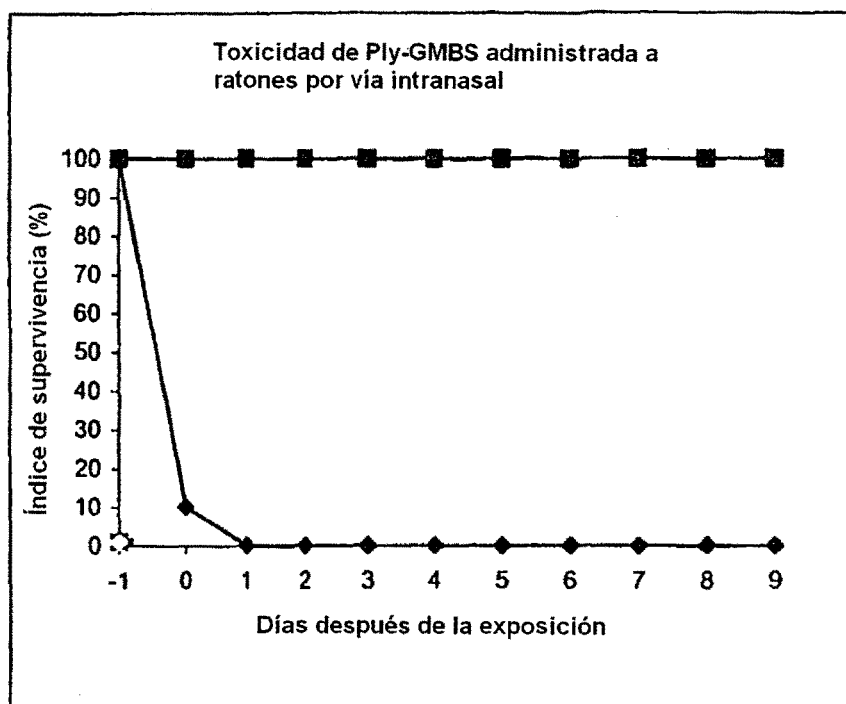


Figura 4

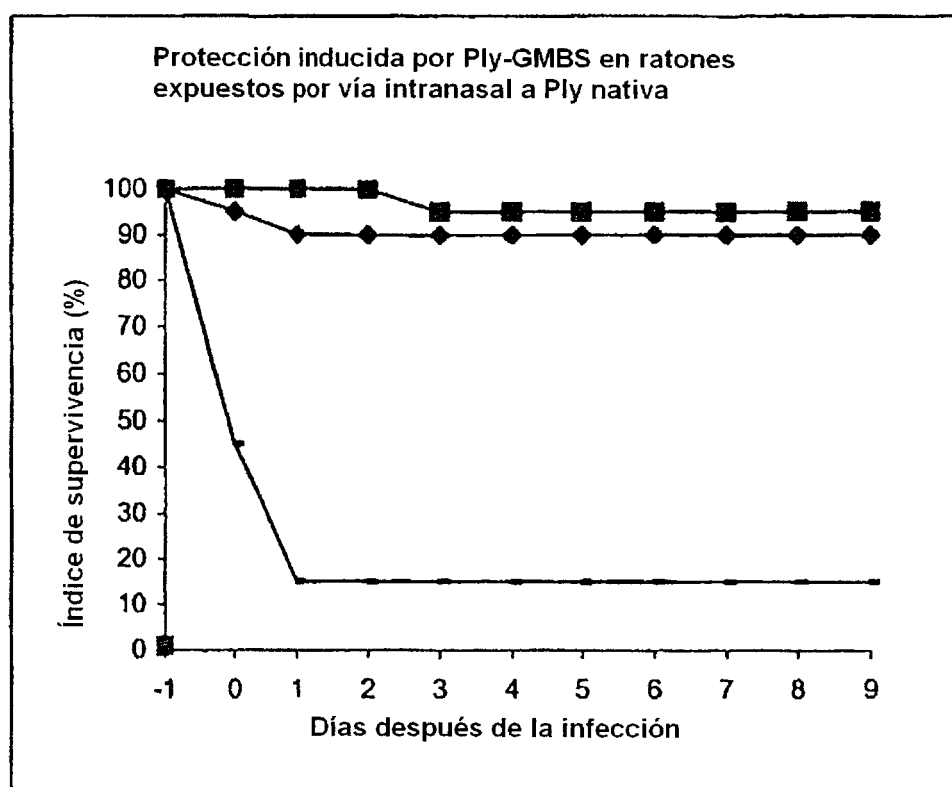


Figura 5
Efecto protector de la neumolisina destoxificada con GMBS y PhtD en un modelo de exposición en ratón

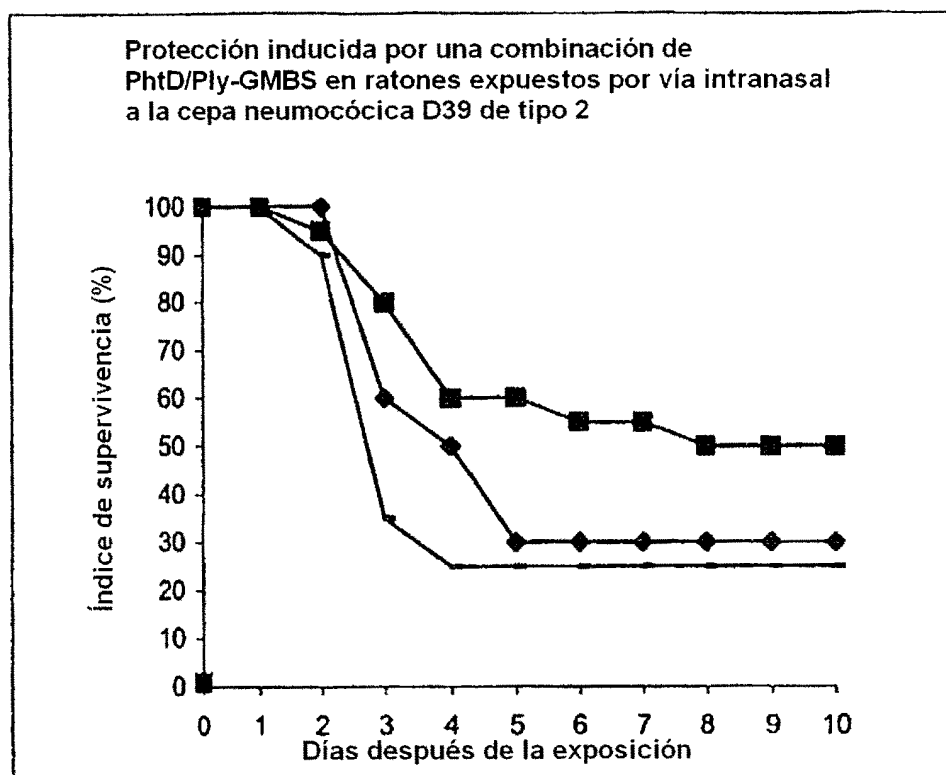
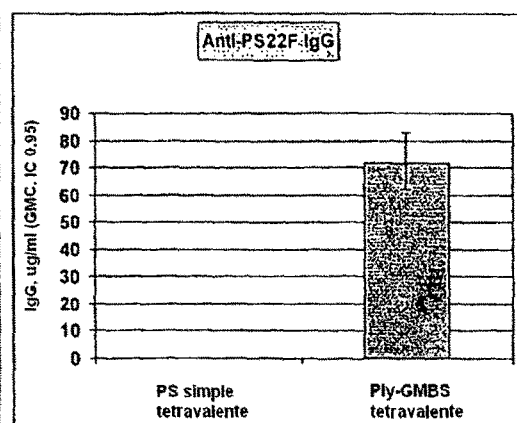
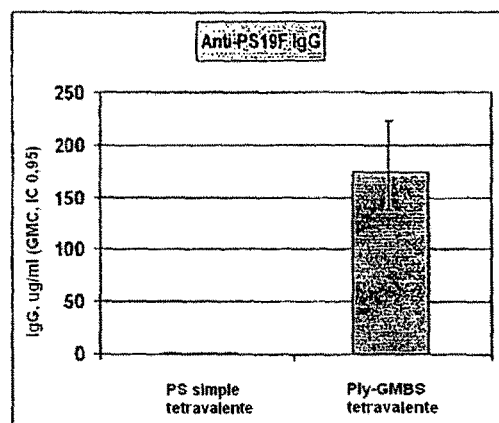
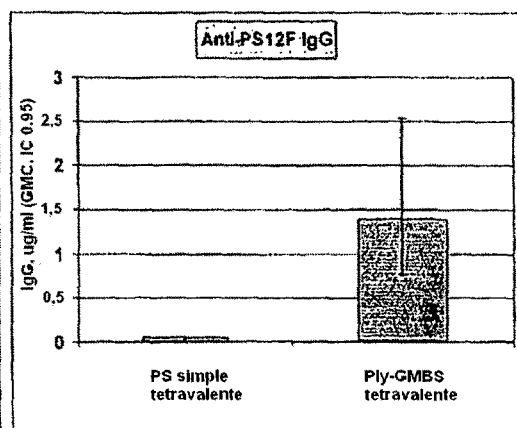
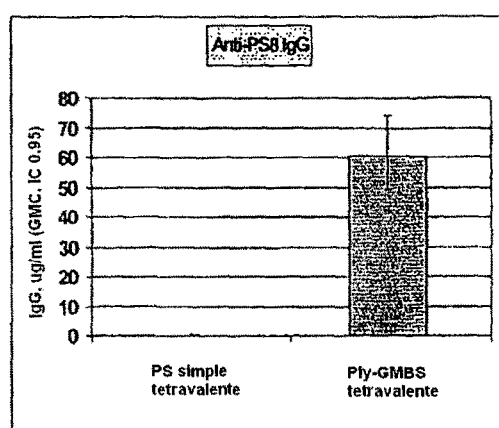


Figura 6

A

B



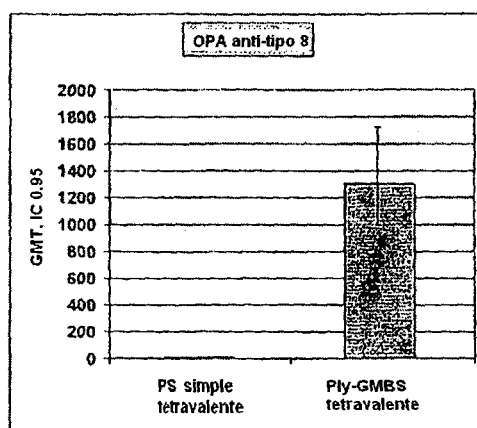
C

D

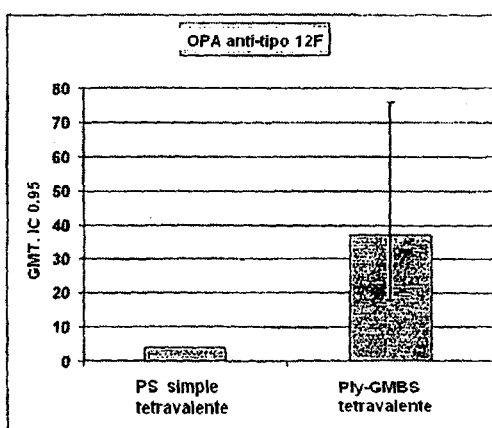
Niveles de anticuerpos IgG anti-PS en suero

Figura 7
Títulos de opsonofagocitosis

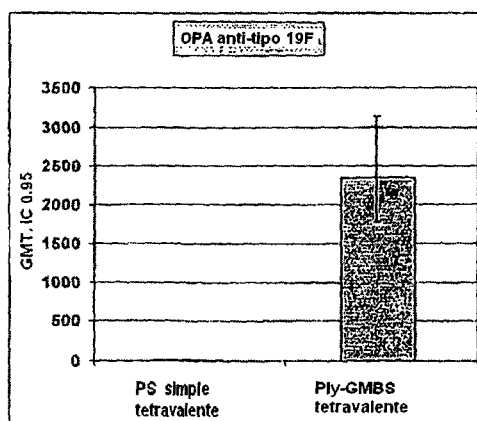
A



B



C



D

