



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 179 105**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **95924122 .5**

86 Fecha de presentación : **08.06.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0764029**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.1997**

54 Título: **Adyuvantes proteínicos.**

30 Prioridad: **10.06.1994 US 258228**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.01.2003**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.06.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.06.2008**

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

72 Inventor/es: **Gajewczyk, Diane, M.;
Boux, Heather, A. y
Klein, Michel, H.**

74 Agente: **Dávila Baz, Ángel**

ES 2 179 105 T5

DESCRIPCIÓN

Adyuvantes proteínicos.

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología y trata particularmente de adyuvantes proteínicos, es decir, materiales que modulan respuestas inmunitarias a un antígeno.

10 Las vacunas se han usado durante muchos años para proteger a los seres humanos y los animales contra una variedad de enfermedades infecciosas. Tales vacunas convencionales consisten en patógenos atenuados (por ejemplo, poliovirus), patógenos muertos (por ejemplo, *Bordetella pertussis*) o componentes inmunogénicos del patógeno (por ejemplo, toxoide de la difteria). Algunos antígenos son altamente inmunogénicos y solos son capaces de provocar respuestas inmunitarias. Otros patógenos, sin embargo, no inducen, por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora o inducen sólo una respuesta inmunitaria débil.

15 La inmunogenicidad puede mejorarse significativamente si los antígenos se co-administran con adyuvantes. Los adyuvantes mejoran la inmunogenicidad de un antígeno pero no son necesariamente inmunogénicos ellos mismos.

20 Agentes inmunoestimulantes o adyuvantes extrínsecos se han usado durante muchos años para mejorar las respuestas inmunitarias del huésped a composiciones inmunogénicas incluyendo vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que típicamente están conectados no covalentemente a antígenos y se formulan para mejorar las respuestas inmunitarias del huésped. Así, se han identificado adyuvantes que mejoran la respuesta inmunitaria a antígenos aportados parenteralmente. Sin embargo, algunos de estos adyuvantes son tóxicos y pueden provocar efectos secundarios no deseables, haciéndolos inadecuados para usar en seres humanos y muchos animales. En efecto, sólo el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (denominados colectivamente alumbre) se usan habitualmente como
25 adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia del alumbre para incrementar respuestas de anticuerpos a los toxoides de la difteria y el tétanos está bien establecida y, más recientemente, se ha usado alumbre como adyuvante en una vacuna de HBsAg. Aunque la utilidad del alumbre está bien establecida para algunas aplicaciones, tiene limitaciones. Por ejemplo, es ineficaz para la vacunación de la influenza y provoca incongruentemente una respuesta inmunitaria mediada por células. Los anticuerpos producidos por antígenos en los que se usa alumbre como adyuvante son principalmente del isotipo IgG1 en el ratón, lo que puede no ser óptimo para la protección mediante algunos
30 agentes vacunales.

35 Por otra parte, los estudios en ratas han demostrado que el alumbre actúa como un adyuvante de IgE (ref. 1 - A través de esta solicitud, diversas referencias se indican entre paréntesis para describir más a fondo el estado de la técnica al que se refiere la invención. La información bibliográfica completa de cada cita se encuentra al final de la memoria descriptiva, precediendo inmediatamente a las reivindicaciones). Los estudios con vacunas de toxoide de tétanos y difteria también indican que la adsorción por alumbre de vacunas induce anticuerpos de IgE en seres humanos (refs. 2, 3, 4). Por lo tanto, aunque la inclusión de una sal de aluminio en una formulación de vacuna puede mejorar su inmunogenicidad y potencia, el hecho de que pueda inducir granulomas locales y anticuerpos de IgE que
40 pueden contribuir a reacciones de hipersensibilidad garantiza un examen cuidadoso de la práctica de adsorción por alumbre de vacunas para uso en seres humanos y animales.

Algunas características de adyuvantes deseables incluyen:

- 45 (1) falta de toxicidad;
- (2) capacidad para estimular una respuesta inmunitaria de larga duración;
- (3) simplicidad de fabricación y estabilidad en el almacenamiento a largo plazo;
- 50 (4) una capacidad para producir respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales a antígenos administrados por diversas rutas, si se requiere;
- (5) sinergia con otros adyuvantes;
- 55 (6) capacidad de interactuar selectivamente con poblaciones de células que presentan antígeno (APC);
- (7) capacidad para producir respuestas inmunitarias específicas para células T_H1 o T_H2 apropiadas;
- 60 (8) capacidad para incrementar selectivamente niveles de isotipo de anticuerpo apropiado (por ejemplo, IgA) contra antígenos; y
- (9) que no contribuyan a reacciones de hipersensibilidad.

65 De relevancia para la presente invención es un análisis del desarrollo de vacunas de pertussis presentado más adelante.

Así, la pertussis o tos ferina es una enfermedad respiratoria grave provocada por la infección del tracto respiratorio por el organismo gram negativo *Bordetella pertussis*. La pertussis es una causa principal de morbilidad en niños y está implicada en 360.000 muertes anualmente (ref. 5). El método más eficaz para controlar la expansión de la enfermedad ha resultado ser el uso de programas de inmunización amplios. La vacuna de pertussis de células enteras, que se observó que tenía eficacia clínica en los 50, ha sido eficaz para controlar epidemias de pertussis (refs. 6, 7, 8). El valor de la vacuna se ilustró cuando Japón, Suecia y Gran Bretaña abandonaron la inmunización habitual con pertussis en niños. Poco después, estos países experimentaron epidemias importantes de pertussis (refs. 9, 10, 11, 12).

Aunque la vacuna de pertussis de células enteras es eficaz para prevenir la incidencia y expansión de la enfermedad, la aceptación y la toma de la vacuna ha estado limitada debido a informes de efectos adversos asociados con la vacuna. Por lo tanto, se creó un impulsó para la creación de una vacuna de pertussis de componentes acelulares no reactogénica, eficaz y bien definida. Una de las características clave de la vacuna celular es el componente de toxina pertussis (PT) químicamente destoxificado. La presencia de toxina pertussis natural en la vacuna de células enteras ha sido una fuente de problemas ya que los estudios en modelos animales han mostrado que puede inducir linfocitosis, sensibilización a histaminas, potenciación de la anafilaxis y anticuerpos de IgE, aumento de la secreción de insulina y muchos otros efectos sistémicos (ref. 13). Las vacunas de pertussis acelulares difieren con respecto a las combinaciones y cantidades de antígenos de *Bordetella pertussis* incluidos en las vacunas, pero los antígenos clave incluyen los aglutinógenos, pertactina, hemaglutinina filamentosa (FHA) y toxina pertussis (PT). Aunque se ha demostrado que la vacuna acelular es inmunogénica y de eficacia comparable con la vacuna de células enteras, no ha sido tan eficaz para prevenir la colonización bacteriana (ref. 14). Además, los resultados de un estudio de campo en Suecia que comparaba las vacunas de pertussis acelular y de células enteras indicaban que la toxina pertussis inactivada con formaldehído presente en las vacunas acelulares mostraba una evidencia de inversión a la toxicidad (ref. 15). Por lo tanto, se requerían otros métodos para inactivar la molécula de toxina pertussis.

Para vencer las desventajas de la destoxificación química, varios grupos desarrollaron moléculas de holotoxina mutante de pertussis genéticamente destoxificada (refs. 16, 17, 18, 19, 20, 21). Un candidato prometedor era el mutante K9G129. No sólo se retenía la inmunogenicidad de la molécula, sino que la toxicidad de esta toxina recombinante se disminuía mucho (refs. 18, 19, 21). Además, la inmunización con el mutante K9G129 estimulaba las respuestas específicas a antígeno de pertussis tanto humorales como celulares (ref. 22). Aunque muchos experimentos clínicos basan la evaluación de la inmunogenicidad de una vacuna solamente en la respuesta de los anticuerpos después de la inmunización, los estudios indican un papel importante para la inmunidad celular en la protección contra esta enfermedad. En modelos animales, se ha demostrado que la respuesta inmunitaria celular es importante en la respuesta protectora contra pertussis ya que la transferencia adoptiva de células de animales convalecientes en animales irradiados sublealmente confería protección de la estimulación con organismos de *Bordetella pertussis* mientras que la transferencia pasiva de suero inmunitario no lo hacía (refs. 23, 24). Un estudio retrospectivo en seres humanos indicaba que la inmunidad mediada por células para *Bordetella pertussis* se correlacionaba con una historia positiva de pertussis (ref. 25). Después de la infección con pertussis natural en seres humanos, se observaba una respuesta inmunitaria tanto de anticuerpos como celular (ref. 26). Sin embargo, la inmunización con las vacunas de células enteras o componentes acelulares daba como resultado respuestas inmunitarias celulares específicas para antígeno de pertussis variables (refs. 27, 28). Parecía que la destoxificación química del componente de toxina pertussis destruía su inmunogenicidad de células T mientras que las respuestas de los anticuerpos estaban inalteradas (ref. 26). Por lo tanto, sólo la molécula de toxina pertussis genéticamente destoxificada podía usarse para estimular una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral.

El uso del mutante de PT recombinante, K9G129, como un componente de vacuna de pertussis se ha establecido bien. Se ha sugerido un número de diferentes formas de la vacuna. Dos formulaciones se han evaluado en seres humanos. La primera formulación consistía en 15 μg del mutante de PT que estaba adsorbido en alumbre con un total de 0,5 mg de alumbre por dosis (refs. 22, 29), mientras que la otra formulación contenía 7,5 μg del mutante K9G129 así como 10 μg de FHA y 10 μg de pertactina y también estaba adsorbido en alumbre (ref. 30). Estos estudios indicaban que el candidato a vacuna de pertussis destoxificada genéticamente no sólo era seguro, inmunogénico y podía inducir una respuesta mediada por células, sino que cuando se combinaba con los antígenos FHA y pertactina, también proporcionaba mejor protección en la prueba de estimulación intracerebral que una vacuna de pertussis de componentes destoxificados químicamente (ref. 30). Otras formulaciones sugeridas incluyen un componente de K9G129 tratado con formaldehído (ref. 31) y una vacuna celular derivada de una cepa de *Bordetella pertussis* que produce la molécula de toxina pertussis K9G129 genéticamente inactivada (ref. 32). El tratamiento con formaldehído de la molécula de K9G129 alteraba la inmunogenicidad de la célula ya que se inducían cantidades inferiores de anticuerpos específicos. La capacidad protectora de la molécula también se disminuía ya que era menos eficaz en el ensayo de estimulación intracerebral (ref. 32). Sin embargo, la vacuna celular recombinante derivada de la cepa que producía K9G129 resultaba ser tan eficaz como la vacuna de pertussis de células enteras (ref. 32).

Aunque las formulaciones precedentes muestran las ventajas de seguridad y eficacia mejoradas asociadas con el uso de una molécula de toxina pertussis genéticamente destoxificada, no se dirigen a los efectos adversos de la vacunación de DPT (difteria, pertussis y tétanos) no asociada con el componente de molécula de pertussis (refs. 33, 46). Todas las formulaciones indicadas implicaban el uso de 0,3 mg de fosfato de aluminio (ref. 32) o 0,5 mg de hidróxido de aluminio (refs. 29, 30). Se introdujeron sales de aluminio en las formulaciones de vacuna de DT y DPT como un adyuvante que potenciaría respuestas fuertes de los anticuerpos cuando los niveles de los toxoides o los números de organismos de *Bordetella pertussis* se disminuyeran para evitar reacciones adversas (refs. 34, 35) y el alumbre se usa ahora habitualmente en estas vacunas como un adyuvante. Sin embargo, años de experiencia de campo con estas

ES 2 179 105 T5

vacunas de pertussis adsorbidas y los estudios (refs. 36, 37) han demostrado que, aunque contienen menor cantidad de los componentes de vacuna reactogénicos identificados, sin embargo se precipitaban reacciones locales (refs. 38, 39, 40, 41, 42). El examen histopatológico de abscesos locales después de la vacunación revela inclusiones de hidróxido de aluminio en células gigantes (ref. 38). La investigación de la frecuencia de tales granulomas indicaba que estaban asociados con el contenido de aluminio en la vacuna ya que los grupos inmunizados con placebo que recibían sólo la fracción de aluminio de la vacuna exhibían formación de abscesos con una velocidad de reacción similar (ref. 43). Una evidencia adicional para apoyar el papel del aluminio en estas reacciones locales se derivó de estudios que comparaban vacunas de cólera y tétanos adsorbidas en adyuvante de aluminio simples (refs. 44, 45). La inoculación profunda de la vacuna en el músculo disminuye la incidencia de estos abscesos pero, aunque técnicas mejoradas pueden prevenir la formación de abscesos (ref. 39), la potenciación de respuestas de IgE por sales de aluminio no está afectada.

Sería ventajoso proporcionar composiciones inmunogénicas que tuvieran respuestas inmunitarias moduladas a los antígenos constituyentes sin las desventajas de la toxicidad local y la contribución a la hipersensibilidad de los adyuvantes extrínsecos de la técnica anterior.

La presente invención se refiere a evitar los problemas asociados con el uso de alumbre como un adyuvante en composiciones inmunogénicas empleando una holotoxina pertussis genéticamente destoxificada, que puede ser por sí misma inmunogénica, para efectuar la modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno no perteneciente al género *Bordetella*.

Aunque la eliminación de alumbre de formulaciones de vacuna podría haber sido un sistema para afrontar a los problemas asociados con el mismo, según se apunta previamente, se incluyó alumbre en las formulaciones de vacuna para proporcionar una respuesta inmunitaria mejorada a los antígenos en la formulación. Podría esperarse, por lo tanto, que la eliminación de alumbre condujera a una formulación menos eficaz y sería improbable que se propusiera.

Sin embargo, la holotoxina pertussis genéticamente destoxificada proporciona sorprendentemente una modulación de la respuesta inmunitaria de un antígeno no perteneciente al género *Bordetella* que permite proporcionar formulaciones de vacuna inyectables y otras composiciones inmunogénicas que exhiben respuestas inmunitarias al menos equivalentes a las alcanzadas usando alumbre como adyuvante.

EP-A-0 725 653 (WO 95/09649), relevante bajo el Artículo 54(3) EPC, describe formas mutantes dobles atóxicas de toxina pertussis en las que Glu¹²⁹ en la subunidad S1 se ha sustituido por otro aminoácido. Se describen composiciones adyuvantes, en particular para la administración a las mucosas, que comprenden la toxina mutante mencionada anteriormente, como un adyuvante, junto con otro antígeno.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de una holotoxina pertussis genéticamente destoxificada en la que al menos uno de Arg⁹, Arg¹³, Trp²⁶, Arg⁵⁸ y Glu¹²⁹ de la subunidad S1 de la holotoxina se ha retirado o reemplazado, para la fabricación de un medicamento inyectable que comprende dicha holotoxina pertussis genéticamente destoxificada, para proporcionar una respuesta inmunitaria potenciada por adyuvante a al menos un antígeno no perteneciente al género *Bordetella* co-administrado con dicha holotoxina pertussis genéticamente destoxificada mediante la misma ruta, siendo potenciadora dicha holotoxina pertussis genéticamente destoxificada para el suministro de dicha respuesta inmunitaria potenciada por adyuvante, en ausencia de un adyuvante extrínseco, y siendo dicho al menos un antígeno no perteneciente al género *Bordetella* (i) un antígeno de patógeno viral, (ii) un antígeno de patógeno bacteriano no perteneciente al género *Bordetella* o (iii) un antígeno de patógeno parasitario no bacteriano y no viral.

La respuesta inmunitaria que es modulada por la presencia de la holotoxina pertussis genéticamente destoxificada puede ser una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. En particular, la respuesta inmunitaria modulada puede ser una IgG mejorada y/o una respuesta celular al otro antígeno.

El antígeno de patógeno viral puede seleccionarse de una amplia gama de tales patógenos. Representantes de tales patógenos incluyen paramixovirus, influenza y hepatitis.

La holotoxina pertussis genéticamente destoxificada puede ser ella misma inmunoprotectora pero el efecto inmunomodulador de la misma puede obtenerse en ausencia de una respuesta inmunitaria a la holotoxina. El suministro de holotoxinas pertussis genéticamente destoxificadas se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.085.862 y 5.221.618, cedidas al presente cesionario.

El término "genéticamente destoxificada", según se usa, aquí tiene el mismo significado que en las Patentes de EE.UU. mencionadas previamente N° 5.085.862 y 5.221.618, a saber un mutante de holotoxina pertussis que exhibe una toxicidad residual de aproximadamente 1% o menos, preferiblemente menor que aproximadamente 0,5% de la de la toxina natural. La toxicidad residual se determina mediante ensayo de aglomeración de células CHO y actividad de ADP-ribosil-transferasa.

Tal holotoxina pertussis genéticamente destoxificada puede formarse mediante la mutagénesis de una secuencia nucleotídica que codifica la holotoxina, según se describe en las patentes mencionadas previamente, de modo que el al menos un aminoácido se retira o reemplaza. También pueden retirarse o reemplazarse múltiples aminoácidos. El al menos un aminoácido que se retira o reemplaza está presente en la subunidad S1 y es específicamente ARG⁹, ARG¹³,

ES 2 179 105 T5

TRP²⁶, ARG⁵⁸ y GLU¹²⁹. Cuando se retiran o reemplazan múltiples aminoácidos, se prefiere retirar o reemplazar (S1) ARG⁹ y GLU¹²⁹. Cuando se efectúa tal mutación, se prefiere reemplazar ARG⁹ por LYS⁹ y GLU¹²⁹ por GLY¹²⁹. (Este mutante específico se representa a veces aquí como K9G129).

5 Más adelante están las Tablas 1a y 2 que contienen detalles de varias mutaciones de holotoxina pertussis que pueden usarse como la holotoxina pertussis genéticamente destoxificada en las composiciones inmunogénicas proporcionadas aquí, a saber los medicamentos cuya fabricación se proporciona mediante el uso de acuerdo con la invención. (Las Tablas aparecen al final del texto descriptivo). La Tabla 1b contiene detalles de la caracterización *in vitro* de las mutaciones de la Tabla 1a.

10 Las composiciones inmunogénicas pueden contener al menos un antígeno de *Bordetella* adicional, incluyendo aglutinógenos, FHA y pertactina.

15 Las composiciones inmunogénicas pueden formularse en ausencia sustancial de un adyuvante extrínseco como una vacuna inyectable para administración a seres humanos o animales. Tal composición de vacuna puede exhibir una respuesta de IgE disminuida.

20 En una modalidad de la invención, las composiciones inmunogénicas pueden formularse en ausencia sustancial de alumbre como una vacuna multivalente que comprende la holotoxina pertussis genéticamente destoxificada en una forma y cantidad inmunoprotectoras junto con toxoide de difteria y toxoide del tétanos como los otros antígenos, proporcionando de ese modo una formulación de vacuna de DTP de la que está ausente el alumbre u otro adyuvante extrínseco. Tales formulaciones de vacuna de DTP habitualmente también contienen otros antígenos de *Bordetella*, incluyendo aglutinógenos, FHA y pertactina.

25 El medicamento fabricado de acuerdo con el uso proporcionado por la invención es útil para obtener una respuesta inmunitaria modulada a un antígeno en un huésped, incluyendo un ser humano; para tal propósito, el al menos un antígeno no perteneciente al género *Bordetella* se administra al huésped, y una holotoxina pertussis genéticamente destoxificada se coadministra al huésped en una cantidad suficiente para modular una respuesta inmunitaria al otro antígeno en ausencia de un adyuvante extrínseco.

30 Según se apunta previamente, la respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria humoral y/o celular y la respuesta inmunitaria modulada puede ser una respuesta inmunitaria de IgE y/o celular mejorada. La administración de la holotoxina pertussis y otro antígeno puede efectuarse administrando al huésped una composición como la descrita previamente y proporcionada de acuerdo con la invención.

35 En la presente invención, se coadministran antígenos y adyuvantes. En esta solicitud, el término “coadministración” significa administraciones simultáneas o administraciones en un período de tiempo corto tal como entre varios minutos u horas y hasta tres días. Las coadministraciones pueden ser en sitios iguales o diferentes.

40 Breve descripción de las figuras

La presente invención se entenderá adicionalmente a partir de la siguiente descripción con referencia a las figuras. Las figuras 7 a 9 se mencionan junto con el Ejemplo 10, que, según se indica más adelante aquí, no está dentro del alcance de la invención según se reivindica aquí. En las figuras:

45 la figura 1 muestra la potenciación de la administración de anticuerpo de IgE de suero murino mediante composiciones inmunogénicas de la presente invención;

50 la figura 2 muestra la producción de anticuerpos de IgG mediante las composiciones inmunogénicas de la presente invención;

la figura 3 muestra la producción de anticuerpos de IgG mediante vacunas multivalentes de la presente invención;

55 la figura 4 muestra la inducción de respuestas inmunitarias celulares mediante vacunas multivalentes de la presente invención;

60 la figura 5 muestra los fenotipos de respuesta inmunitaria T_h1 y T_h2, según se determina mediante el perfil de citoquinas en ratones inmunizados con ovalbúmina con PPD y toxina pertussis PT genéticamente destoxificada (K9G12) como adyuvante;

65 la figura 6 muestra los fenotipos de respuesta inmunitaria T_h1 y T_h2 según se determina mediante perfiles de inmunoglobulina IgG2a e IgGE específica para ovalbúmina en ratones inmunizados con PPD y toxina pertussis genéticamente destoxificada, PT (K9GK9);

la figura 7 muestra el número de ratones libres de tumores en experimentos de inmunoterapia efectuados aquí. Se inmunizaron seis grupos de ratones con cinco ratones por grupo con medio de cultivo celular como un control y 10⁴ células de melanoma vivas. La gráfica muestra el número de ratones que no tenía tumores treinta días después de la estimulación;

la figura 8 muestra los volúmenes de los tumores el día 30 a partir de dos de los seis grupos de ratones, representados frente al número de días después de la estimulación con 10^5 células de melanoma vivas. Las cajas abiertas con las líneas punteadas representan los cinco ratones que se inmunizaron sólo con 10^4 células irradiadas (grupo 2) y los círculos cerrados conectados por las líneas sólidas representan los cinco ratones inmunizados con células irradiadas más $1 \mu\text{g}$ de K9G129 (grupo 3); y

la figura 9 muestra los volúmenes de tumores el día 22. Los ratones se inmunizaron con medio de cultivo celular como un control y 10^4 células de melanoma irradiadas solas o junto con CFA o concentraciones crecientes de K9G129. Los volúmenes de los tumores de cada uno de los cinco ratones en los seis grupos se muestran 22 días después de la estimulación con 10^5 células de melanoma vivas. Para los tres últimos grupos (ratones que recibían K9G129), los números junto a las flechas muestran el número de ratones que estaban libres de tumores.

Descripción general de la invención

En referencia a la figura 1, se ilustra la potenciación de niveles de IgE séricos en ratones inmunizados con una vacuna de DTP con adyuvante de alumbre, acelular, inactivada químicamente y una vacuna acelular de rDTP sin adyuvante de alumbre, que comprende el análogo de PT K9G129 genéticamente destoxificado. Los resultados indican que los niveles de IgE séricos en ratones inmunizados con la vacuna acelular de rDTP se disminuían significativamente ($p < 0,05$) con relación a la vacuna acelular de DTP que contenía la molécula de toxina pertussis convertida químicamente en toxoide.

En referencia a las figuras 2 y 3 y la Tabla 3, se ilustra una comparación de niveles de anticuerpo específico para antígeno producidos después de la inmunización de ratones con una vacuna de células enteras de DTP con adyuvante de alumbre, una preparación de vacuna acelular de DTP con adyuvante de alumbre y una vacuna de DTP que contiene al análogo de PT genéticamente destoxificado K9G129 sin adyuvante de alumbre. Los resultados mostrados en la Tabla 3 indican que la respuesta de IgG anti-PT y las concentraciones de neutralización de CHO producidas por la vacuna acelular de DTP con adyuvante de alumbre y la vacuna acelular de DTP recombinante sin adyuvante de alumbre son equivalentes. Así, aunque la formulación recombinante libre de alumbre demostraba una actividad potenciadora de IgE disminuida, sin embargo retenía su eficacia como una vacuna de pertussis según se indicaba por estas concentraciones de IgG anti-toxina pertussis. Una evidencia adicional de la retención de inmunogenicidad específica para PT se obtuvo a partir de ensayos de neutralización de células CHO. Significativamente, se detectaron niveles superiores de anticuerpos de IgG anti-aglutinógeno 2+3 y anti-69 kD (pertactina) en las muestras de suero de ratones inmunizados con formulación recombinante libre de alumbre ($p < 0,05$). Las respuestas de IgG anti-toxoide de FHA eran equivalentes en sueros obtenidos de ratones inmunizados con cualquiera de las vacunas.

La figura 3 muestra los niveles de anticuerpo de IgG anti-toxoide del tétanos y anti-toxoide de la difteria en sueros de ratones inmunizados con la vacuna de pertussis de células enteras, la vacuna de DTP acelular de componentes definidos que contiene la molécula de pertussis destoxificada con glutaraldehído o la vacuna de DTP acelular recombinante libre de alumbre. Los componentes de toxoide de difteria y tétanos en la última vacuna también estaban desprovistos de alumbre. Los resultados indican que las formulaciones acelulares inducen anticuerpos de IgG anti-toxoide del tétanos y particularmente anti-toxoide de la difteria significativamente superiores según se medía mediante este ensayo. Por otra parte, la formulación recombinante libre de alumbre inducía respuestas de IgG anti-toxoide del tétanos y la difteria significativamente superiores con relación a la vacuna DTP de componentes acelulares.

La capacidad de las formulaciones de vacuna de DTP para inducir respuestas inmunitarias celulares específicas para el antígeno se evaluó *in vitro* y los resultados se muestran en la figura 4. Esplenocitos derivados de ratones inmunizados con las vacunas de DTP de células enteras, acelulares o acelulares recombinantes libres de alumbre se cultivaron en presencia de los antígenos de vacuna específicos. La vacuna de DTP de células enteras inducía una respuesta celular anti-toxoide de la difteria significativa aunque no en el mismo grado que la generada por la vacuna de DTP de componentes acelulares. La vacuna de componentes acelulares inducía una respuesta proliferativa específica de antígeno de pertussis relativamente pobre con la excepción de las respuestas anti-69 kD y anti-toxoide de la difteria. Sin embargo, era significativo el índice proliferativo específico de antígeno notablemente incrementado inducido por la formulación acelular recombinante libre de alumbre en respuesta a todos los antígenos probados. La formulación recombinante inducía claramente los niveles más altos de respuestas proliferativas específicas para antígeno de cualquiera de las vacunas probadas.

El medicamento fabricado de acuerdo con el uso proporcionado por la invención puede en una modalidad de tal medicamento ser una vacuna de DTP acelular libre de alumbre que contiene al análogo de PT genéticamente destoxificado K9G129. Así, aunque la formulación libre de alumbre no contenga un adyuvante extrínseco (por ejemplo, un mineral) sí contiene sin embargo un adyuvante ya que el mutante K9G129 actúa no sólo como un antígeno sino también como un adyuvante (es decir, un adyuvante proteínico). Esta propiedad es evidente en las respuestas específicas para antígeno de pertussis medidas mediante inmunoensayo enzimático (figura 2). Eran evidentes respuestas de IgG anti-aglutinógeno 2+3 y anti-69 kD (pertactina) significativamente superiores en las muestras de suero derivadas de ratones inmunizados con la formulación de vacuna de pertussis acelular recombinante libre de alumbre mientras que las respuestas específicas para toxoide de FHA eran equivalentes. Por lo tanto, la nueva formulación inducía respuestas de anticuerpo específicas para antígenos de vacuna de pertussis a niveles que eran comparables a o mayores que los niveles inducidos por la vacuna de pertussis acelular adsorbida en alumbre.

ES 2 179 105 T5

También se evaluó la actividad del adyuvante intrínseco general del mutante K9G129 para otros antígenos de vacuna (tales como los antígenos presentes en vacunas humanas, tales como vacunas de combinación pediátricas). Se compararon las respuestas de IgG específicas para toxoides del tétanos y la difteria en suero obtenido de ratones inmunizados con las vacunas de pertussis de células enteras o acelular adsorbidas en alumbre o las vacunas recombinantes libres de alumbre (figura 3). Las concentraciones de IgG específica para el tétanos y la difteria en el suero de ratones inmunizados con la vacuna de células enteras eran significativamente inferiores que las observadas en cualquiera de los grupos inmunizados con DTP acelular. Aunque la vacuna de DTP adsorbida en alumbre inducía respuestas específicas para el toxoide significativamente superiores con relación al grupo inmunizado con vacuna de células enteras, de todas las formulaciones de vacuna probadas, la formulación libre de alumbre inducía las concentraciones más altas de IgG específica para toxoide. Por lo tanto, la actividad como adyuvante del mutante K9G129 no está restringida sólo a antígenos de *Bordetella*. El medicamento fabricado de acuerdo con el uso proporcionado por la invención puede ser una vacuna multivalente que contiene antígenos protectores para una pluralidad de patógenos.

Preparación y uso de vacunas

Según se indica previamente, la presente invención en una modalidad proporciona composiciones inmunogénicas, adecuadas para usarse como, por ejemplo, vacunas. La composición inmunogénica provoca una respuesta inmunitaria por el huésped al que se administra incluyendo la producción de anticuerpos por el huésped. Las composiciones inmunogénicas incluyen al menos un antígeno no perteneciente al género *Bordetella*. Este antígeno puede ser un patógeno inactivado o una fracción antigénica de un patógeno, siendo el patógeno un virus o una bacteria particular o un parásito como los definidos previamente aquí. El patógeno puede inactivarse mediante un agente químico, tal como formaldehído, glutaraldehído, β -propiolactona, etilenimina y derivados, u otros compuestos. El patógeno también puede inactivarse mediante un agente físico, tal como radiación UV, radiación gamma, "choque térmico" y radiación por rayos X. Patógenos virales representativos de los que puede derivarse el antígeno incluyen paramixovirus, influenza y hepatitis.

Una fracción antigénica de un patógeno puede producirse por medio de métodos de descomposición químicos o físicos, seguidos, si se desea, por la separación de una fracción por medio de cromatografía, centrifugación y técnicas similares. En general, se obtienen a continuación componentes de bajo peso molecular que, aunque están purificados, pueden tener baja inmunogenicidad.

Alternativamente, pueden prepararse antígenos o haptenos por medio de métodos sintéticos orgánicos, o, en el caso de, por ejemplo, polipéptidos y proteínas, por medio de métodos de DNA recombinante.

El medicamento se prepara como productos inyectables, como soluciones líquidas o emulsiones. Los antígenos y las composiciones inmunogénicas pueden mezclarse con portadores fisiológicamente aceptables que son compatibles con los mismos. Estos pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La vacuna puede contener además sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponadores del pH, para mejorar adicionalmente su eficacia. Las vacunas pueden administrarse mediante inyección subcutáneamente o intramuscularmente.

Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, formulaciones de liberación sostenida y pueden contener de 1 a 95% de las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Los medicamentos se administran de una manera compatible con la formulación para dosificación, y en una cantidad tal para que sean terapéuticamente eficaces, protectores o inmunogénicos. La cantidad que ha de administrarse depende del sujeto que ha de inmunizarse, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos y, si es necesario, para producir una respuesta inmunitaria mediada por células. Las cantidades precisas de antígeno y composición inmunogénica que han de administrarse dependen del juicio del médico. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados son fácilmente determinables por los expertos en la técnica y pueden ser del orden de microgramos a miligramos. Regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero pueden incluir una administración inicial seguida por administraciones subsiguientes. La dosificación de la vacuna también puede depender de la ruta de administración y variará de acuerdo con el tamaño del huésped.

La concentración de antígenos en una composición inmunogénica que constituye un medicamento cuya fabricación es proporcionada mediante el uso de acuerdo con la invención es en general de 1 a 95%. Una vacuna que contiene material antigénico de sólo un patógeno es una vacuna monovalente. Las vacunas que contienen material antigénico de varios patógenos son vacunas combinadas y también pertenecen a la presente invención. Tales vacunas combinadas o multivalentes contienen, por ejemplo, material de diversos patógenos o de diversas cepas del mismo patógeno, o de combinaciones de diversos patógenos.

Inmunoensayos

En una modalidad, la composición inmunogénica es útil para la generación de anticuerpos específicos para antígeno que son ellos mismos útiles en la identificación específica de ese antígeno en un inmunoensayo. Tales inmunoensayos incluyen ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), RIAs y otros ensayos de unión a anticuerpos sin enzimas ligadas o procedimientos conocidos en la técnica. En ensayos de ELISA, los anticuerpos específicos para el antígeno se inmovilizan sobre una superficie seleccionada; por ejemplo, los pocillos de una placa de microvaloración

ES 2 179 105 T5

de poliestireno. Después de lavar para retirar anticuerpos adsorbidos de forma incompleta, una proteína no específica, tal como una solución de albúmina de suero bovino (BSA) o caseína, que se sabe que es antigénicamente neutra con respecto a la muestra de prueba, puede unirse a la superficie seleccionada. Esto permite el bloqueo de sitios de adsorción no específicos sobre la superficie inmovilizadora y así reduce el fondo provocado por uniones no específicas de antígenos sobre la superficie. La superficie inmovilizadora se pone a continuación en contacto con una muestra, tal como materiales clínicos o biológicos, que ha de probarse de una manera que conduce a la formación de un complejo inmunitario (antígeno/anticuerpo). Esto puede incluir diluir la muestra con diluyentes, tales como BSA, gammaglobulina bovina (BGG) y/o solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween. La muestra se deja incubar a continuación durante de aproximadamente 2 a 4 horas, a temperaturas tales como del orden de aproximadamente 25°C a 37°C. Después de la incubación, la superficie puesta en contacto con la muestra se lava para retirar material no inmunocomplejado. El procedimiento de lavado puede incluir lavar con una solución tal como PBS/Tween o un tampón de borato.

Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre el antígeno en la muestra de prueba y los anticuerpos específicos para el antígeno unidos, y el lavado posterior, puede determinarse la presencia, e incluso la cantidad, de formación de inmunocomplejo sometiendo al inmunocomplejo a un segundo anticuerpo que tiene especificidad para el antígeno. Para proporcionar medios de detección, el segundo anticuerpo puede tener una actividad asociada, tal como una actividad enzimática, que generará, por ejemplo, un desarrollo de color durante la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. La cuantificación puede alcanzarse a continuación midiendo el grado de generación de color usando, por ejemplo, un espectrofotómetro del espectro visible.

Ejemplos

La descripción previa describe generalmente la presente invención. Una comprensión más completa puede obtenerse mediante referencia a los siguientes Ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen solamente con propósitos de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se contemplan cambios en la forma y la sustitución de los equivalentes según puedan sugerir o hacer convenientes las circunstancias. Aunque se han empleado aquí términos específicos, tales términos están considerados en un sentido descriptivo y no con propósitos de limitación.

El Ejemplo 10 no está dentro del alcance de la invención según se reivindica aquí; de acuerdo con esto, las figuras 7 a 10, mencionadas aquí, no ilustran la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Este Ejemplo describe la formulación de vacunas.

La vacuna de células enteras de DTP y una vacuna acelular compuesta experimental fueron producidas por Connaught Laboratories Ltd. La vacuna de pertussis acelular compuesta se adsorbió en alumbre (1,5 mg/dosis) y consistía en 10 µg de nitrógeno proteínico de toxina pertussis convertida en toxoide por glutaraldehído, 5 µg de nitrógeno proteínico de cada uno de FHA y los aglutinógenos 2 y 3 y 3 µg de pertactina junto con 5 Lf de toxoide del tétanos y 25 Lf de toxoide de difteria por dosis. La vacuna compuesta recombinante también contenía 5 µg de nitrógeno proteínico de cada uno de FHA y los aglutinógenos 2 y 3 y 3 µg de nitrógeno proteínico de pertactina además de 5 Lf de toxoide del tétanos y 25 Lf de toxoide de difteria por dosis. Sin embargo, variaba con respecto a la otra vacuna acelular en que contenía 20 µg de nitrógeno proteínico de la holotoxina mutante de PT recombinante, K9G129, y no estaba adsorbida en alumbre. La molécula de toxina pertussis K9G129 así como los componentes de FHA purificados, aglutinógenos 2+3 y pertactina se obtuvieron individualmente de Connaught Laboratories Ltd.

Ejemplo 2

Este Ejemplo describe la inmunización de animales.

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra que pesaban de 15 a 18 gramos de Charles River Canada (St. Constant, Quebec). Los ratones se alojaron en microaisladores y se usaron de acuerdo con las pautas establecidas por the Canadian Council of Animal Care (CCAC). Los animales estaban libres de patógenos específicos y las habitaciones de alojamiento se controlaron con respecto a brotes del virus de la hepatitis murina a través del uso de ratones centinela. Se proporcionó agua a voluntad y la dieta estaba libre de ovalbúmina. Los ratones fueron inmunizados el Día 0 con las formulaciones de vacuna en grupos de seis. Una dosis de refuerzo de vacuna se administró el Día 21. El Día 28 los animales fueron sangrados a través de laceración de la vena yugular y esplenectomizados. Las muestras de suero se almacenaron a -20°C hasta que se ensayaban.

Ejemplo 3

Este Ejemplo describe inmunoensayos específicos para antígeno.

Las respuestas de IgG específica para antígeno de vacuna se determinaron mediante EIA indirecto. Los antígenos de interés eran toxina pertussis, pertactina, hemaglutinina filamentosa, aglutinógenos, así como toxoides de difteria

ES 2 179 105 T5

y tétanos. Se revistieron microplacas de alta capacidad de unión (Nunc) con 4 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los antígenos previos en un volumen de 50 μl /pocillo de tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6. Después de una incubación nocturna, las placas se lavaron y se bloquearon sucesivamente con una solución al 0,1% de albúmina de suero bovino (Sigma) durante una hora a temperatura ambiente. El bloqueo en exceso se retiró y las microplacas se lavaron. Las muestras de suero murino se diluyeron a continuación secuencialmente en PBS-Tween 20 (0,05%) y se cultivaron en placas en un volumen de 100 μl . Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C. La fracción específica para antígeno de anticuerpos de IgG se detectó mediante un conjugado de anti-(IgG de ratón) ovina conjugada a peroxidasa (Jackson Laboratories). Las placas se revelaron con el sustrato TMB como previamente y se leyeron a longitudes de onda dobles de 450 nm y 540 nm en el lector de microplacas Multiskan MCC 340 MkII. Las concentraciones reactivas se definieron como la dilución a la que la absorbancia de la muestra de prueba era equivalente a la media más tres desviaciones estándar de los valores de absorbancia del control negativo. Las medias geométricas y los intervalos de confianza del 95% se calcularon y los grupos se compararon usando la prueba t de Student.

15 Ejemplo 4

Este Ejemplo describe la determinación de perfiles de la subclase de IgG específica para ovalbúmina.

Se midieron las concentraciones de IgG, IgG1 e IgG2a específicas para ovalbúmina en muestras de suero murino mediante EIA indirecto. En el ensayo de IgG2a, se revistieron microplacas de 96 pocillos Nunc Maxisorp (Gibco/BRL) con una fracción de IgG de anticuerpo policlonal anti-ovalbúmina de conejo (Cappel Laboratorios) diluida en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, y se revistieron durante la noche a temperatura ambiente. Las respuestas de IgG e IgG1 específicas para ovalbúmina se midieron sobre microplacas revestidas directamente con ovalbúmina (Sigma) diluida hasta una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de carbonato 50 mM. Al día siguiente, las microplacas se lavaron en PBS-T y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con una solución de leche desnatada en polvo al 0,1% diluida en PBS-T. Después de una etapa de lavado adicional, una solución de 10 $\mu\text{g/ml}$ de ovalbúmina (Sigma) diluida en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, se añadió al ensayo específico para IgG2a. Este revestimiento de antígeno se incubó durante una hora a temperatura ambiente y fue seguido por una etapa de lavado.

La siguiente etapa en el ensayo requería la adición de las muestras de suero murino. En el ensayo de IgG2a, las muestras de suero se diluyeron en serie tres veces empezando con una dilución inicial de 1:40 y terminando con una dilución de 1:87480. Los ensayos de IgG e IgG1 se llevaron a cabo con muestras de suero diluidas tres veces empezando con una dilución inicial de 1:360 y acabando con una dilución final de 1:787320. Las muestras de suero se diluyeron en PBS-T y se añadieron a los pocillos de las microplacas en volúmenes de 100 μl . Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron y las subclases de anticuerpos de IgG específica para ovalbúmina se detectaron con conjugados de anti-(IgG de ratón) de rata biotinilados específicos para cada subclase de anticuerpo de IgG (conjugado de IgG2a, derivado del clon R19-15 y obtenido de Pharmingen, conjugado de IgG1, derivado del clon LO-MGI-2 y obtenido de Serotec), mientras que las respuestas de IgG se detectaron con una dilución de 1:50.000 de una anti-(IgG de ratón) ovina marcada con peroxidasa (específica para Fc μ , Jackson Laboratories). Los anticuerpos monoclonales conjugados se diluyeron hasta una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió estreptavidina conjugada a peroxidasa a cada pocillo de las placas que contenía un conjugado biotinilado a una concentración de 500 mg/ml. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. La IgG específica para el antígeno unida y los anticuerpos de la subclase de IgG se detectaron mediante la adición del sustrato de peroxidasa, TMB al 10% (ADI Diagnostics) diluida en peróxido de hidrógeno al 0,005% (Fisher Scientific). Se dejó que las reacciones avanzaran durante un período de diez minutos, en cuyo punto se terminaron mediante la adición de ácido sulfúrico 1M (Fisher Scientific) a cada pocillo. Las microplacas se leyeron en un lector de microplacas (Multiskan MCC 340MkII, Flow Laboratories) a longitudes de onda dobles de 450 nm y 540 nm. Las concentraciones reactivas se definieron como la última dilución a la que la absorbancia de la muestra de prueba era equivalente a la media más tres desviaciones estándar de los valores de absorbancia del control negativo. Las medias geométricas se calcularon sobre datos transformados logarítmicamente y se expresaron con intervalos de confianza del 95%.

Ejemplo 5

Este Ejemplo describe inmunoensayos de IgE total.

Los niveles de IgE total en suero se determinaron mediante EIA indirecto. Se revistieron inmunoplasmas Nunc (Gibco/BRL) a temperatura ambiente durante la noche con un antisuero policlonal anti-(IgE de ratón) ovino (Serotec) diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6. Al día siguiente, las placas se lavaron en PBS que contenía Tween 20 (J.T. Baker) al 0,05% y a continuación se bloquearon con aminoácidos de caseína (Difco) al 0,1% durante una hora a temperatura ambiente. Después de que la solución de bloqueo en exceso se eliminara por lavado de las placas, las muestras de suero murino se diluyeron en serie tres veces en el diluyente de ensayo y se dispusieron en placas sobre la microplaca a 100 μl por pocillo. Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C. Para detectar los anticuerpos de IgE unidos, un anticuerpo monoclonal anti-(IgE de ratón) de rata biotinilado (Serotec) se añadió a cada pocillo a una concentración hasta 2 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa (Dimension Laboratories) a cada pocillo. La cantidad de IgE unida a los pocillos se determinó añadiendo el sustrato enzimático, tetrametilbencidina (TMB) (ADI Diagnostics) al 10% en agua

ES 2 179 105 T5

con peróxido de hidrógeno al 0,005% (Fisher Scientific). La reacción se detuvo después de diez minutos con ácido sulfúrico 1M (Fisher Scientific). La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm con una corrección del fondo a 540 nm sobre un lector de microplacas Multiskan MCC 340 MkII (Flow Laboratories). Los niveles de IgE en suero se cuantificaron calibrando las absorbancias de la muestra frente a una curva estándar generada mediante una proteína de mieloma murino de IgE diluida en serie desarrollada sobre cada placa. Las medias geométricas y los intervalos de confianza de 95% se calcularon para cada grupo de tratamiento y los grupos se compararon usando la prueba t de Student y $p < 0,05$.

10 Ejemplo 6

Este Ejemplo describe al determinación de inmunoglobulinas de IgGF específicas para ovalbúmina.

Las concentraciones de IgE específica para ovalbúmina en los sueros de ratones inmunizados se determinaron mediante el uso de un EIA de captura de antígeno indirecto. Brevemente, microplacas Nunc Maxisorp (Gibco/BRL) se revistieron con una fracción de IgG anti-ovalbúmina de conejo (Cappel Laboratories). Las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, después de lavar en PBS-T, las placas se bloquearon con una solución de leche desnatada en polvo al 0,1% diluida en PBS-T durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, una solución de ovalbúmina diluida hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, se añadió a cada pocillo en volúmenes de 100 μl . Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la solución de ovalbúmina se separó por lavado de las placas. Las muestras de suero murino se diluyeron a continuación en serie tres veces en PBS-T a una dilución inicial de 1:40 y una dilución final de 1:87480. Se añadieron muestras de 100 μl por pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de lavar al día siguiente, los anticuerpos de IgE específicos para ovalbúmina unidos a las placas se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-(IgE de ratón) de rata (clon LO-ME-2, Serotec) diluido hasta 2 $\mu\text{g/ml}$ en PBS-T. Después de una hora más de incubación a temperatura ambiente, este anticuerpo se separó por lavado y se añadió estreptavidina conjugada a peroxidasa (Vector Laboratories) a cada pocillo a una concentración de 500 ng/ml. La cantidad de IgE específica para ovalbúmina en las muestras de suero murino se detectó añadiendo el sustrato de peroxidasa, tetrametilbencidina (TMB) (ADI Diagnostics) al 10% en peróxido de hidrógeno al 0,005%. Se dejó que se desarrollara el color en los pocillos durante quince minutos y las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 μl de ácido sulfúrico 1M (Fisher Scientific). La absorbancia de los pocillos se midió en un lector de microplacas (Multiskan MCC 340 MkII, Flow Laboratories) a 450 nm con una lectura a 540 nm para la corrección del fondo. Las concentraciones reactivas se definieron como la última dilución a la que el valor de la absorbancia de la muestra de prueba era equivalente a la media de los valores de absorbancia derivados de un control de suero negativo más tres desviaciones estándar (134.139). Las medias geométricas se calcularon sobre datos transformados logarítmicamente y se expresaron con intervalos de confianza de 95%.

Ejemplo 7

40 Este Ejemplo describe la determinación de perfiles de citoquina murina.

Los niveles de IL-4 e IFN- γ se determinaron en un EIA de tipo sándwich. Brevemente, microplacas Nunc Maxisorp de 96 pocillos (Gibco/BRL) se revistieron durante la noche a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales de rata específicos para citoquina. Estos anticuerpos se obtuvieron de Pharmingen y se derivaban de los siguientes clones respectivos: IL-4, clon 11B11; IL-5; IFN- γ , clon R4-6A2. Los anticuerpos monoclonales se diluyeron hasta una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6. Al día siguiente, las placas se lavaron en PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) y los sitios de unión no específica se bloquearon mediante la adición de una solución de albúmina de suero bovino (Sigma) al 1% diluida en PBS-T. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, el bloqueo en exceso se lavó de las placas y sobrenadantes de cultivo no diluidos se añadieron a los pocillos por duplicado. Los patrones recombinantes apropiados para cada citoquina (IL-4 recombinante obtenida de Pharmingen, IFN- γ recombinante adquirido de Genzyme) se diluyeron hasta las concentraciones apropiadas (concentración inicial de 100 mg/ml o 1000 mg/ml para EIA de IL-10) y se diluyeron en serie tres veces en RMP 1640 (Sigma) que contenía suero bovino fetal (SBS) al 10%. Los patrones se dispusieron en placas a 100 $\mu\text{l/pocillo}$ y las microplacas se incubaron durante la noche a 4°C. Después de un lavado vigoroso en PBS-T, las citoquinas unidas se detectaron usando un anticuerpo monoclonal biotinilado específico para cada citoquina y se diluyeron hasta una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ en PBS-T. Los anticuerpos se obtuvieron de Pharmingen y se derivaban de los siguientes clones: IL-4, clon BVD6-24G2; IFN- γ , clon XMG1.2. Después de una etapa de incubación de una hora a temperatura ambiente, se añadió una preparación de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Vector Laboratories) diluida hasta una concentración de 500 mg/ml. Se realizó un lavado final después de una incubación de una hora a temperatura ambiente de la preparación de estreptavidina. Las placas se desarrollaron mediante la adición del sustrato, TMB al 10% en agua con peróxido de hidrógeno (Fisher Scientific) al 0,05%. Se dejó que las reacciones avanzaran hasta que se alcanzaba una intensidad de color adecuada y se detuvieron mediante la adición de 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de una solución 1M de ácido sulfúrico (Fisher Scientific). Las absorbancias de los pocillos de reacción se leyeron a longitudes de onda dobles (450 nm y 540 nm) sobre un lector de microplacas Multiskan MCC 340 MkII (Flow Laboratories).

65 Las concentraciones de citoquinas en los sobrenadantes se cuantificaron calibrando las absorbancias de la muestra frente a las absorbancias de los patrones de concentraciones conocidas usando el algoritmo de ajuste de curvas logístico para ajustar la curva con un coeficiente de correlación mínimo de 99,9. Se usó el paquete de soporte lógico ELISA+

ES 2 179 105 T5

(Meddata) para cuantificar las cantidades de citoquinas presentes en los sobrenadantes basándose en las curvas estándar generadas sobre cada placa.

5 Ejemplo 8

Este Ejemplo describe respuestas inmunitarias celulares específicas para antígeno.

Se obtuvieron esplenocitos murinos de los ratones BALB/c inmunizados con vacuna el día 28. Los bazo se disociaron en una suspensión de células simples y se lavaron tres veces en medio RPMI 1640 (Sigma). Se realizó un conteo de células usando el método de exclusión con azul de tripano y las células se ajustaron hasta una concentración de 2×10^6 células/ml. Los antígenos (toxoides de pertussis, pertactina, FHA, aglutinógenos y toxoides de difteria y tétanos no adsorbidos en alumbre se diluyeron hasta una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$ en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%. Los antígenos se diluyeron a continuación en serie dos veces hasta una concentración de 78 ng/ml. Las células se añadieron a continuación a cada pocillo a una concentración final de 1×10^5 células/pocillo. Los cultivos se dejaron incubar a 37°C en un incubador de CO_2 al 5% durante 72 horas. Al final de este período, las células se sometieron a impulsos con $0,5 \mu\text{Ci/pocillo}$ de timidina tritiada (Amersham) diluida en PBS estéril (Sigma). Después de 18 horas adicionales de incubación, las células se recogieron sobre papel de filtro de fibra de vidrio usando un recogedor de 96 pocillos (Canberra Packard) y los conteos radiactivos se leyeron en un contador beta Matrix 96 (Canberra Packard). Los resultados se expresaron como índices de estimulación que se calculaban dividiendo las medias de los conteos de prueba por las medias de los conteos de fondo en cada placa. Cada muestra se ensayó por triplicado.

Ejemplo 9

Este Ejemplo describe la capacidad de anticuerpos para neutralizar toxina pertussis en el ensayo de neutralización de células CHO.

La capacidad de los anticuerpos inducidos por las vacunas de pertussis para neutralizar toxina pertussis se determinó en el ensayo de células CHO según se describe por Granstrom y otros (ref. 47). La última dilución de anticuerpo a la que no podían observarse efectos morfológicos significativos se definió como la concentración neutralizadora. Los resultados se expresaron como concentraciones neutralizadoras recíprocas.

35 Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra el uso de holotoxina pertussis genéticamente destoxificada para conferir protección profiláctica contra el desarrollo de tumores.

Así, se usó el modelo de melanoma de ratón B16 (ref. 54) para determinar la eficacia de K9G129 como un adyuvante en la inmunoterapia del cáncer. Cuando se inyectaban subcutáneamente ratones C57B1/6 con cepa B16-F1 singeneica viva de células de melanoma B16, aparecían tumores después de aproximadamente 10 días y crecían progresivamente de una manera exponencial. La aparición de tumores era directamente proporcional a la dosis de células inyectadas, por ejemplo, los tumores se formaban antes cuando los ratones se inyectaban con 10^6 células que con 10^4 células. Los tumores podían retrasarse inmunizando los ratones con células de melanoma B16 que se habían irradiado en primer lugar con 10.000 rads. Este retraso también era dependiente de la dosis. Inmunizar con 10^6 células irradiadas provocaba un retraso mayor en la aparición de los tumores que inmunizar con 10^5 células irradiadas, cuando los ratones se estimulaban subsiguientemente con 10^5 células vivas. Inmunizar con 10^4 células irradiadas no provocaba un retraso significativo en el crecimiento del tumor.

La eficacia de K9G129 como un adyuvante se probó midiendo su capacidad para retrasar el crecimiento de tumores cuando se combinaba con 10^4 células irradiadas en un experimento de inmunización. Seis grupos de ratones con cinco ratones por grupo se inmunizaron con:

- 55 1) medio de cultivo celular (control)
- 2) 10^4 células irradiadas
- 3) 10^4 células irradiadas + $1 \mu\text{g}$ de K9G129
- 60 4) 10^4 células irradiadas + $5 \mu\text{g}$ de K9G129
- 5) 10^4 células irradiadas + $10 \mu\text{g}$ de K9G129
- 65 6) 10^4 células irradiadas + CFA (adyuvante completo de Freund).

A los ratones se les administró una dosis de refuerzo de la misma manera dos semanas más tarde y a continuación dos semanas después del refuerzo se estimularon con 10^5 células de melanoma B16 vivas. Se controló la aparición de

ES 2 179 105 T5

tumores y el tamaño de los tumores crecientes se midió con calibres, anotando tanto la longitud como la anchura. El volumen de los tumores se calculó aplicando estas medidas a la forma de un elipsoide.

5 K9G129 era eficaz de una manera dependiente de la dosis para retrasar el comienzo del crecimiento del tumor. Treinta días después de la estimulación con 10^5 células de melanoma vivas, no había ratones sin tumores en los grupos que no recibían inmunización (grupo 1), recibían células irradiadas solas (grupo 2) o células irradiadas con CFA (grupo 6). Tampoco había ratones libres de tumores en el grupo que había recibido células irradiadas con $1 \mu\text{g}$ de K9G129 (grupo 3). Sin embargo, había dos y cuatro ratones, respectivamente, que no tenían tumores de los grupos que habían recibido células irradiadas con $5 \mu\text{g}$ y $10 \mu\text{g}$ de K9G129 (grupos 4 y 5) (figura 7). Estos resultados muestran un gran retraso en la aparición de tumores mediado por dos concentraciones superiores de K9G129.

15 Incluso la concentración más baja de K9G129 usada provocaba un retraso en la aparición de tumores. Cuatro de cinco ratones en el grupo 3 (células irradiadas + $1 \mu\text{g}$ de K9G129) tenían tumores aparecidos después de que los tumores hubieran empezado a crecer en los ratones que se habían inmunizado con células irradiadas solas (grupo 2) (figura 8). La eficacia de K9G129 para retrasar el crecimiento de tumores se demuestra adicionalmente comparando los volúmenes de los tumores de ratones individuales en los diversos grupos, 22 días después de la estimulación con células de melanoma vivas. Los tumores son inexistentes o sus tamaños son generalmente inferiores en ratones que se inmunizaban con células irradiadas y K9G129 que en ratones inmunizados con células irradiadas solas o junto con CFA (figura 9).

20 Estos resultados indican que K9G129 puede actuar como un adyuvante en la inmunoterapia del cáncer para incrementar la respuesta inmunitaria hacia células tumorales.

25 Ejemplo 11

Este Ejemplo describe la generación de una respuesta de Th1 a un inmunógeno con el adyuvante análogo de toxina pertussis S1 (K9G129).

30 Uno de los factores clave implicados en la potenciación de diferentes subclases de inmunoglobulina, incluyendo IgE, es la presencia de mediadores solubles conocidos como citoquinas. El control de la producción de IgE es regulado por una variedad de citoquinas que no sólo posee funciones efectoras directas tales como la inducción del cambio del isotipo de inmunoglobulina, sino también actúan para regular cruzadamente la producción de otras citoquinas. En el ratón, IL-4 actúa no sólo para inducir el cambio de los isotipos IgE e IgG1, sino también actúa para inhibir la secreción de IgM, IgG3, IgG2b e IgG2a (ref. 48). Por otra parte, IFN- γ actúa para estimular la producción de IgG2a e IgG3 mientras que inhibe la síntesis de IgG1, IgG2b e IgE (ref. 48).

40 En un esfuerzo para organizar y racionalizar los efectos múltiples y reguladores cruzados de las citoquinas, se ha descrito un sistema para describir los diversos modelos de secreción de citoquinas (ref. 49). Mosmann y Coffman (ref. 49) definieron dos subgrupos distintos de células T CD4⁺ murinas basándose en sus modelos diferenciales de secreción de citoquinas. Usando clones de células T a largo plazo, pudieron mostrar que un grupo de células, definido como Th2, secretaban IL-4, IL-5 e IL-10, mientras que otro grupo de células, definido como Th1, secretaba IL-2, IFN- γ y TNF- β . Estos dos perfiles distintos de citoquinas también se correlacionaban con la producción de inmunoglobulinas ya que los clones Th1 proporcionaban ayuda a los linfocitos B para producir IgG2a mientras que los clones Th2 promovían la secreción de IgG1 e IgE por células B (48, 50, 51). Un trabajo ulterior de Romagnani y colaboradores demostraba la existencia de estos subgrupos de células T también en seres humanos (ref. 52).

55 Aunque la diferenciación inicial de perfiles de citoquina Th1/Th2 se definió sobre la base de modelos de citoquinas *in vitro* de clones de células T individuales, las definiciones se han ampliado para describir los fenotipos de citoquina resultantes de la inmunización o la infección (ref. 48, 53). Estos fenotipos no son tan claramente polares como los observados en el análisis clonal original y se definen mediante una variedad de citoquinas diferentes. Así, una respuesta fenotípica Th1 se caracteriza por un incremento significativo en citoquinas de tipo Th1 (relaciones superiores de IFN- γ :IL-4) con relación a fenotipos de respuesta inmunitaria Th2. Esta clasificación también se amplía a los perfiles de subclases de inmunoglobulinas específicas para antígeno donde los fenotipos Th1 se presentan como relaciones de IgG2a:IgE superiores con relación a las respuestas del tipo Th2.

La figura 5 muestra el perfil de citoquinas en ratones inmunizados con albúmina y potenciados con adyuvante de PPD y PT(K9G129). PPD es un adyuvante que produce una respuesta inmunitaria Th1.

60 Se obtuvieron esplenocitos de ratones inmunizados con ovalbúmina junto con rPT S1(K9G129) o PPD como adyuvantes. Las células de bazo de cuatro ratones en cada grupo de tratamiento se reunieron y a continuación se volvieron a estimular *in vitro* con ovalbúmina sola (sin adyuvante). Los sobrenadantes se recogieron a continuación de estos cultivos y los niveles de IFN- γ e IL-4 se determinaron mediante EIA. Se obtuvieron relaciones de IFN- γ :IL-4 similares a partir de cultivos derivados de ratones inmunizados con S1(K9G129) o PPD como una adyuvante. Según se describe previamente, una relación superior de citoquinas IFN- γ :IL-4 es característica de una respuesta inmunitaria Th1.

ES 2 179 105 T5

La figura 6 muestra las respuestas de IgG2a e IgE específicas para ovalbúmina de ratones BALB/c inmunizados con ovalbúmina y el análogo de PT S1(K9G129) o PTD como adyuvantes. La gráfica de barras indica que la inmunización con el análogo de PT S1(K9G129) daba como resultado relaciones de IgG2a:IgE específicas para ovalbúmina similares a las obtenidas después de la inmunización con PPD. Según se describe previamente, una relación de IgG2a:IgE alta es característica de una respuesta inmunitaria Th1. Los resultados en las figuras 5 y 6 indican así que el potencial con adyuvante PT(K9G129) produce una respuesta inmunitaria Th1 en ratones.

Sumario de la descripción

Resumiendo esta descripción, la presente invención proporciona el uso de una holotoxina pertussis genéticamente destoxificada, que también puede ser inmunogénica, como un adyuvante proteínico en lugar de adyuvantes extrínsecos convencionales, particularmente alumbre, para la fabricación de un medicamento inyectable para usar para alcanzar una respuesta inmunitaria modulada a un antígeno no perteneciente al género *Bordetella* sin los efectos secundarios adversos del alumbre.

TABLA 1a

Mutaciones introducidas en Toxina Pertussis

Número de Mutación	Mutación
1.	ARG ⁹ → ▲ ⁹
2.	“ → GLU ⁹
3.	“ → LYS ⁹
4.	“ → HIS ⁹
5.	ARG ¹³ → ▲ ¹³
6.	“ → GLU ¹³
7.	ARG ⁹ -ARG ¹³ → ▲ ⁹⁻¹³
8.	ARG ⁹ ARG ¹³ → GLU ⁹ GLU ¹³
9.	ARG ⁵⁸ → GLU ⁵⁸
10.	ARG ⁵⁷ ARG ⁵⁸ → ▲ ⁵⁷ ▲ ⁵⁸
11.	TRP ²⁶ → ALA ²⁶
12.	“ → CYS ²⁶
x 13.	CYS ⁴¹ → ALA ⁴¹

ES 2 179 105 T5

TABLA 1a (continuación)

	Número de Mutación	Mutación
5	x 14.	“ -> SER ⁴¹
10	X 15.	CYS ²⁰¹ -> ALA ²⁰¹
	x 16.	GLU ¹²⁹ -> ▲129
15	17.	“ -> GLY ¹²⁹
	18.	“ -> GLN ¹²⁹
	19.	“ -> ASP ¹²⁹
20	20.	“ -> ASN ¹²⁹
	21.	“ -> LYS ¹²⁹
25	22.	“ -> ARG ¹²⁹
	23.	“ -> HIS ¹²⁹
	24.	“ -> PRO ¹²⁹
30	25.	“ -> CYS ¹²⁹
	26.	“ -> GLY ¹²⁹ II
35	27.	“ -> GLN ¹²⁹ II
	x 28.	TYR ¹³⁰ -> ▲130
	x 29.	“ -> PHE ¹³⁰
40	30.	GLU ¹²⁹ TYR ¹³⁰ -> GLY ¹²⁹ ALA ¹³⁰
	31.	GLU ¹²⁹ TYR ¹³⁰ -> GLN ¹²⁹ ALA ¹³⁰
45	32.	GLU ¹²⁹ TYR ¹³⁰ -> GLY ¹²⁹ PHE ¹³⁰
	x 33.	S3)LYS ¹⁰ -> GLN ¹⁰
	x 34.	(S3)TYR ⁹² LYS ⁹³ -> ASN ⁹² ARG ⁹³
50	x 35.	(S3)LYS ¹⁰⁵ -> ASN ⁰⁵
	x 36.	CYS ⁴¹ CYS ²⁰¹ -> ALA ⁴¹ ALA ²⁰¹
55	37.	CYS ⁴¹ GLU ¹²⁹ -> ALA ⁴¹ GLY ¹²⁹
	38.	ARG ⁹ GLU ¹²⁹ -> GLU ⁹ GLY ¹²⁹ II
	39.	ARG ⁹ GLU ¹²⁹ -> GLU ⁹ GLN ¹²⁹ II
60	40.	ARG ⁹ GLU ¹²⁹ -> GLU ⁹ ARG ¹²⁹
	41.	ARG ⁹ GLU ¹²⁹ TYR ¹³⁰ -> GLU ⁹ GLY ¹²⁹ ALA ¹³⁰
65	42.	ARG ¹³ GLU ¹²⁹ -> GLU ¹³ GLY ¹²⁹ II

ES 2 179 105 T5

TABLA 1a (continuación)

	Número de Mutación	Mutación
5		
	43.	ARG ¹³ GLU ¹²⁹ -> GLU ¹³ GLN ¹²⁹ II
10	44.	ARG ¹³ GLU ¹²⁹ TYR ¹³⁰ -> GLU ¹³ GLY ¹²⁹ ALA ¹³⁰
	45.	ARG ⁹ GLU ¹²⁹ -> ▲9 GLN ¹²⁹ S-2730-1-1
	46.	ARG ⁹ GLU ¹²⁹ TYR ¹³⁰ -> ▲9 GLY ¹²⁹ ALA ¹³⁰
15	47.	ARG ¹³ GLU ¹²⁹ -> ▲13 GLN ¹²⁹
	48.	ARG ¹³ GLU ¹²⁹ TYR ¹³⁰ -> ▲13 GLY ¹²⁹ ALA ¹³⁰
20	49.	GLU ¹²⁹ -> GLY ¹²⁹
	x 50.	Tipo Salvaje
25	51.	Arg13 -> Lys13
	52.	Arg58 -> His58
	53.	Arg58 -> Lys58
30	x 54.	His35 -> Ala35
	55.	Glu129 -> Ser129
35	X 56.	Tyr130 -> Ser130
	57.	Arg58Glu129 -> Glu58Gly129
	58.	Arg9Glu129 -> Lys9Gly129
40	59.	Arg9Arg58Glu129 -> Lys9Glu58Gly129
	X 60.	(S3) Ile91Tyr92Lys93 -> Supresión
45	x 61.	(S2) Thr91Arg29Asn93 -> Supresión
	62.	(S1) Glu129/(S3) -> Supr. (S1) Gly129/S3(91-93) Ile91Tyr92Lys93
50	63.	(S1) Arg58Glu129/S3(91-93) -> Supresión (S1)Glu58Gly129/S3(91-93)
55	64.	(S1) Arg9Glu129/S3(91-93) -> Supresión (S1) Lys9Gly129/S3(91-93)
60		
65		

ES 2 179 105 T5

TABLA 1a (continuación)

5 Número de Mutación	Mutación	Mutación
10 65.	(S1) Arg ⁹ Arg ⁵⁸ Glu ¹²⁹ /S3(91- 93)	-> Supresión (S1)Lys ⁹ Glu ⁵⁸ Gly ¹²⁹ S3(91-93)
15 x 66.	(S2) Thr ⁹¹ Arg ⁹² Asn ⁹³ /S3(91- 93)	-> Supresión S2(91-93) Supresión S3(91-93)
20 x 67.	(S3) TYR ⁸²	-> ALA ⁸²
x 68.	(S3) ILE ⁹¹	-> ▲ ⁹¹ ▲ ⁹² ▲ ⁹³
x 69.	(S3) TYR ¹⁰² TYR ¹⁰³	-> A ¹⁰² A ¹⁰³
25 x 70.	(S3) LYS ¹⁰⁵	-> ▲ ¹⁰⁵
x 71.	(S3) LYS ¹⁰⁵	-> ALA ¹⁰⁵
x 72.	(S3) LYS ¹⁶⁹	-> ALA ¹⁶⁹
30 x 73.	(S3) TYR ⁸² LYS ¹⁶⁹	-> ALA ⁸² ALA ¹⁶⁹
x 74.	(S4) TYR ⁴	-> ALA ⁴
35 x 75.	(S4) TYR ²¹	-> ALA ²¹
x 76.	(S4) LYS ⁵⁴ LYS ⁵⁷	-> ALA ⁵⁶ ALA ⁵⁷
40 x 77.	(S3) TYR ⁸² (S4) LYS ⁵⁴ LYS ⁵⁷	-> (S3)ALA ⁵² /(S4)ALA ⁵⁴ AL A ⁵⁷
45 78.	(S1) GLU ¹²⁹ /(S3)TYR ⁸²	-> (S1) GLY ¹²⁹ /S3(▲82)
79.	(S1) GLU ¹²⁹ /S3(ILE ⁹¹ TYR ⁹² LYS ⁹³)	-> (S1) GLY ¹²⁹ /(S3) ▲ ⁹¹ ▲ ⁹² ▲ ⁹³

50 Notas:

La numeración de aminoácidos corresponde a las posiciones en las subunidades naturales.

Todas las mutaciones están en la subunidad S1 a no ser que se especifique que estén en S2, S3 o S4.

II indica el uso de un codón alternativo.

▲ indica un residuo o residuos suprimidos.

Tipo salvaje se refiere a PT expresada a partir del operón TOX no mutado en *B. parapertussis*.

x mutantes cuyo uso no está incluido dentro del alcance de la invención según se reivindica aquí.

65

ES 2 179 105 T5

TABLA 1b

*Caracterización in vitro de análogos de toxina pertussis obtenidos a partir de
B. paraptussis recombinante*

5	Número de	Toxicidad	Actividad	Epítipo S1
	Mutación	Residual (%)	ADPR (%)	
10	1.	0,2	ND	-
	2.	0,1	0,2	+/-
15	3.	0,1	ND	++++
	4.	0,2	0,1	+++
	5.	0,3	ND	-
20	6.	5,0	ND	++++
	7.	0,4	0,1	-
25	8.	0,1	0,9	-
	9.	0,7	0,6	+++
	10.	0,4	ND	-
30	11.	0,5	ND	+
	12.	6,0	ND	ND
35	x 13.	0,3	0,4	-
	x 14.	1,4	ND	ND
	x 15.	0,2	0,1	-
40	16.	0,1	ND	++
	17.	0,1	0,3	++++
45	18.	0,02	0,1	+/-
	19.	0,7	2,5	++
	20.	0,1	0,3	++
50	21.	0,3	0,2	-
	22.	0,1	ND	-
55	23.	0,2	ND	-
	24.	0,2	ND	+
60				
65				

ES 2 179 105 T5

TABLA 1b (continuación)

	Número de Mutación	Toxicidad Residual (%)	Actividad de ADPR (%)	Epítopo S1
5	25.	0,4	ND	-
10	26.	0,1	0,3	++++
	27.	0,02	0,1	+/-
15	x 28.	0,2	0,1	-
	x 29.	12,0	ND	++++
	30.	0,2	0,6	-
20	31.	0,4	ND	-
	32.	1,0	ND	++++
25	x 33.	100	ND	+++++
	x 34.	50	100	++++
	x 35.	20	ND	++++
30	x 36.	0,2	0,1	-
	37.	0,1	0,1	-
35	38.	0,1	0,1	-
	39.	0,1	ND	-
	40.	0,1	ND	-
40	41.	0,2	ND	-
	42.	0,5	ND	-
45	43.	3,0	ND	-
	44.	0,3	ND	-
	45.	0,4	ND	-
50	46.	0,2	0,1	-
	47.	0,5	ND	-
55	48.	0,4	0,3	-
	49.	0,2	0,1	++++
	x 50.	100	100	++++
60	51.	14,0		+++++
	52.	35,0		+++++
65	53.	13,0		+++++

ES 2 179 105 T5

TABLA 1b (continuación)

5	Número de Mutación	Toxicidad Residual (%)	Actividad de ADPR (%)	Epítipo S1
	x 54.	0,2		++
10	55.	0,6		+++++
	x 56.	29,0		++++
15	57.	0,1		++
	58:	<0,001	<0,001	+++
	59.	0,1		+
20	x 60.	12,0		+++++
	x 61.	100,0		+++++
25	62.	0,03	0,2	+++
	63.	0,1		+
	64.	0,1		+++
30	65.	0,1		+
	x 66.	10,0		+
35	x 67.	7,2	96	ND
	x 68.	4,6	108	ND
	x 69.	9,6	98	ND
40	x 70.	8,1	57	ND
	x 71.	94	71	ND
45	x 72.	102	71	ND
	x 73.	5,2	92	ND
	x 74.	46	125	ND
50	x 75.	84	91	ND
	x 76.	9,6	55	ND
55	x 77.	1,5	97	ND
	78.	0,04	0,10	ND
60	79.	0,04	0,16	ND

Notas:

65 La toxicidad residual es la relación de la concentración de PT aparente determinada mediante el ensayo de aglomeración de células CHO a la concentración real de mutantes de PT determinada mediante ELISA expresada como un porcentaje.

ES 2 179 105 T5

La actividad ADPR es la extensión de la ribosilación por ADP de transducina bovina catalizada por un análogo de PT, con relación a la catalizada por una concentración igual de PT de tipo salvaje, expresada como un porcentaje.

5 El epítipo S1 se refiere a la expresión de un epítipo S1 inmunodominante reconocido por un anticuerpo monoclonal específico PS21 (ATCC HB 10299 depositado el 30 de Noviembre de 1989), en comparación con la PT de tipo salvaje (+++++).

ND indica no determinado.

10 x Mutantes cuyo uso no está incluido dentro del alcance de la invención según se reivindica aquí.

TABLA 2

15 *Residuos de aminoácidos funcionales en toxina pertussis para la mutación*

<u>Subunidad</u>	<u>Residuos</u>	<u>Sustitución Preferida</u>
20 S1	Phe-23	Asp o Glu
	Ser-48	Ala
	Val-51	Ile
	25 Gln-127	Ala o Asp
	Leu-131	Lys o Arg
	Gly-199	Val o Gln
	30 Ala-200	Ile
35 S2	Phe-235	Glu
	His-15	Ala o Thr
	Gln-16	Ala o Thr
	Trp-52	Val
	40 Glu-66	Ala o Lys
	Asp-81	Ala o Ser
	Leu-82	Ala o Glu
	Lys-83	Glu
	45 Ser-104	Ala
	Arg-125	Ala
	Ser-147	Thr
50 Arg-150	Ser	
Lys-151	Ser	

55

60

65

ES 2 179 105 T5

TABLA 2 (continuación)

	<u>Subunidad</u>	<u>Residuos</u>	<u>Sustitución Preferida</u>	
5	S3	Gln-15	Ala o Thr	
		Gln-16	Ala o Thr	
10		Tyr-82	Ala o Val	
		Arg-83	Glu	
		Ser-104	Ala	
15		Arg-125	Ala	
		Arg-150	Ser	
		Arg-151	Ser	
20		S4	Asp-1	Ala
			Tyr-4	Ala o Val
	Gly-60		Val	
25	Ser-61		Ala	
	Glu-65		Ala	
	Arg-69		Ala	
	Thr-88		Val	
30	Pro-93		Ala	
	Asp-54		Glu	
	Thr-51		Tyr	
35		Thr-55	Tyr	
		Gly-58	Val	
40	S5	Ser-62	Ala	

TABLA 3

Inmunogenicidad del componente de toxina pertussis de una vacuna acelular de DTP y una vacuna de DTP acelular que contiene un análogo de PT genéticamente destoxificado

Formulación de la Vacuna	IgG anti-toxina pertussis Concentración reactiva	Concentración neutralizadora de células CHO recíprocas
Vacuna acelular de DTP	1.363.678	50,8
Vacuna acelular recombinante	1.363.678	40,3

Referencias

1. Bergstrand H., Andersson I., Nystrom I., Pauwels R., Bazin H. (1983) The Non-specific enhancement of allergy. II. Precipitation of anaphylactic *in vitro* response capacity and serum IgE and IgG2a antibody synthesis in primed but non-responding rats by injection of alum. *Allergy* 38:247-260.

2. Cogne M., Ballet J.J. Schmitt C., Bizzini B. (1985) Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminum adsorbed and nonadsorbed tetanus toxoid in humans. *Ann. Allergy* 54:148-151.

ES 2 179 105 T5

3. **Nagel J., Svcc D., Waters T., Fireman P.** (1977) IgE Synthesis in Man: I. Development of specific IgE antibodies after immunization with Tetanus-Diphtheria (Td) toxoids. *J. Immunol.* 118:334-341.
4. **Hedenskog S., Bjorksten B., Blennow M., Granstrom., Granstrom M.** (1989) Immunoglobulin E response to pertussis toxin in whooping cough and after immunization with a whole cell and an acellular pertussis vaccine. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89:156-161.
5. World Health Statistics (1992) immunization coverage. World Health Organization, Geneva, pp. 19-24.
- 10 6. Medical Research council (1951) *Br. Med. J.* 2:1464-1472.
7. Medical Research Council (1956) *Br. Med. J.* 2:454-462.
8. Medical Research Council (1959) *Br. Med. J.* 1:994-1000.
- 15 9. **Fine P.E., Clarkson J.A.** (1987) Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev. Infect. Dis.* 9:866-883.
10. **Kanai K.** (1980) Japan's experience in pertussis epidemiology and vaccination in the past thirty years. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 33:107-143.
- 20 11. **Miller D.L. Alderslade R., Ross E.M.** (1982) Whooping cough and whooping cough vaccine: the risks and benefits debate. *Epidemiol. Rev.* 4:1-24.
12. **Romanus V., Jonsell R., Bergquist S.O.** (1988) Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr. Infect. dis.* 6:364-371.
- 25 13. **Munoz J.J., Arai H., Bergman K., Sadowski P.L.** (1981) Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 33:820-826.
14. **Marwick C.** (1988) Pertussis vaccines: Trials and Tribulations. *JAMA* 259:2057-2059.
15. **Storsaeter J., Hallander E., Farrington C.P., Olin P., Molby R., Miller E.** (1990) Secondary analyses of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccine* 8:457-461.
- 35 16. **Loosmore, S. Zealey, G., Cockle S. Boux, H., Chong, P., Yacoob, R. y Klein, M.** (1993) Characterization of pertussis toxin analogs containing mutations in B-oligomer subunits. *Infect. Immun.* 61:2316-2324.
17. **Burnette W.N., Cieplak W., Smith S.G., Keith J.M.** (1989) Effects of mutations on enzyme activity and, immunoreactivity of the S1 subunit of pertussis toxin. *Infect. Immun.* 57:3660-3662.
- 40 18. **Loosmore S., Cockle S., Zealey G., Boux H., Cockle S., Radika K., Fahim R., Zobrist G., Yacoob R.K., Chong P., Yao F.L., Klein M.** (1990) Engineering of genetically detoxified pertussis toxin analogs for development of a recombinant whooping cough vaccine. *Infect. Immun.* 58:3653-3662.
- 45 19. **Nencioni L., Pizza M., Bugnoli M., DeMagistris T., Di Tomasso A., Giovannoni F., Manetti R., Marsili I.; Matteucci G., Nucci D., Olivieri R., Pileri P., Presentini R., Villa L., Kreeftenberg J.G., Silvestri S., Tagliaube A., Rappuoli R.** (1990) Characterization of generically inactivated pertussis toxin mutants: Candidates for a new vaccine against whooping cough. *Infect. Immun.* 58:1308-1315.
- 50 20. **Lobet Y., Cieplak W., Mar V.L., Kaljot K.T., Sato H., Keith J.M.** (1988) Pertussis toxin S1 mutant with reduced enzyme activity, and a conserved protective epitope. *Science* 242:72-74.
21. **Pizza M., Covacci A., Bartolini A., Perugini M., Nencioni Z., DeMagistris T., Villa L., Nucci D., Manetti R., Bugnoli M., Giovannoni F., Olivieri R., Barbieri J., Sato H., Rappuoli R.** (1989) Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 246:497-499.
- 55 22. **Podda A., Nencioni L., Demagistris M., Di Tomasso A., Bossu P., Nuti S., Pileri P., Peppoloni S., Bugnoli M., Ruggiero P., Marsili I., D'Errico A., Tagliabue A., Rappuoli R.** (1990) Metabolic, humoral and cellular responses in adult volunteers immunized with the genetically inactivated pertussis toxin mutant PT-9K/1296. *J. Exp. Med.* 172:861-868.
23. **Mills K.H.G., Barnard A., Watkins J., Redhead K.** (1993) Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: Role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect. Immun.* 61:399-410.
- 65 24. **Redhead K., Watkins J., Barnard A., Mills K.H.G.** (1993) Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* 61:3190-3198.

ES 2 179 105 T5

25. De **Magistris M., Romano M., Nuti S., Rappuoli R., Tagliabue A.** (1988) Dissecting human T cell responses against *Bordetella* species. *J. Exp. Med.* 168:1331-1362.
26. **Gearing A.J.H., Bird C.R., Redhead K., Thomas M.** (1989) Human cellular immune responses to *Bordetella pertussis* infection. *FEMS Microbiol. Immunol.* 47:205-212.
27. **Tomoda T., Ogura H., Kurashige T.** (1991) Immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *J. Inf. Dis.* 163:559-563.
28. **Petersen J.W., Ibsen. P.H., Bentzon M.W., Capiou C., Heron I.** (1991) The cell mediated and humoral immune response to vaccination with acellular and whole cell pertussis vaccine in adult humans. *FEMS Microbiol. Immunol.* 76:279-288.
29. **Podda A., DeLuca E., Titone L., Casadel A., Cascio A., Peppoloni S., Volpini G., Marsili I., Nencioni L., Rappuoli R.** (1992) Acellular pertussis vaccine composed of genetically inactivated pertussis toxin: Safety and immunogenicity in 12-to-24 and 2-to-4 month old children. *J. Pediatr.* 120:680-685.
30. **Podda A., Nencioni L., Marsili I., Peppoloni S., Volpini G., Donati D., Di Tommaso A., De Magistris T., Rappuoli R.** (1991) Phase I clinical trial of an acellular pertussis vaccine composed of genetically detoxified pertussis toxin combined with FHA and 69 RD. *Vaccine* 9:741-745.
31. **Nencioni L., Volpini G., Peppoloni S., Bugnoli M., DeMagistris T., Marsili I., Rappuoli R.** (1990) Properties of Pertussis toxin mutant PT-9K/129G after formaldehyde treatment. *Infect. Immun.* 59:625-630.
32. **Marsili I., Pizza M., Giovannoni F., Volpini G., Bartalini M., Olivieri R., Rappuoli R., Nencioni L.** (1992) Cellular pertussis vaccine containing a *Bordetella pe-tussis* strain that produces a nontoxic pertussis toxin molecule. *Infect. Immun.* 60:1150-1155.
33. **Long S.S., Deforest A.,** Pennridge Pediatric Associates, Smith D.G., Lazaro C., Wassilak G.F. (1990) Longitudinal study of adverse reactions following Diphtheria-Tetanus-Pertussis vaccine in infancy. *Pediatrics* 85:294-302.
34. **Butler N.R., Voyce M.A., Burland W.L., Hilton M.J.** Advantages of aluminum hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br. Med. J.* 1:663-666.
35. **Aprile M.A., Wardlaw A.C.** (1966) Aluminum compounds as adjuvants for vaccines and toxoids in man: A review. *Can J. Pub. Health* 5.7:343-354.
36. **Pineau A., Durand C., Guillard O., Bureau B., Stalder J.** (1992) Role of aluminum in skin reactions after diphtheria-tetanus-pertussis-poliomyelitis vaccination: An experimental study in rabbits. *Toxicology* 73:117-125.
37. **Goto N., Akama K.** (1982) Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol. Immunol.* 26:1121-1132.
38. **Erdohazi M., Newman R.L.** (1971) Aluminum hydroxide granuloma. *Br. Med. J.* 3:621-623
39. **Bernier R.H., Frank J.A., Nolan T.F.** (1981) Abscesses complicating DTP vaccination. *Am. J. Dis. Child.* 135:826-828
40. **Cox N.H., Moss C., Forsyth A.** (1988) Cutaneous reactions to aluminum in vaccines: an avoidable problem. *Lancet* ii, 43.
41. **Strom J.** (1967) Further experience of reactions, especially of a cerebral nature, in conjunction with triple vaccination: A study based on vaccinations in Sweden 1959-1965. *Br. Med. J.* 4:320-323.
42. **Lione A.** (1986) More on aluminum in infants. *New England J. Med.* 314:923.
43. **Gupta R.K.7 Sharma S.B., Ahuja S., Saxena S.N.** (1987) The effect of aluminum phosphate adjuvant on the potency of pertussis vaccine. *J. Biol. Stand.* 15:99-101.
44. **Saroso J.S., Bahrawi W., Witjaksono 14, Budiarmo R.L.P., Brotowasisto B., DeWitt W.R., Gomez C.Z.** (1978) A controlled field trial of plain and aluminum hydroxide adsorbed cholera vaccines in Surabaya, Indonesia, during 1973-1975. *Bull. WHO* 56:619.
45. **Collier L.H., Polakoff S., Mortimer J.** (1979) Reactions and antibody responses to reinforcing. doses of adsorbed and plain tetanus vaccines. *Lancet* i: 1364.

ES 2 179 105 T5

46. **Gupta R.K., Relyveld E.H.** (1991) Adverse reactions after injection of adsorbed diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) vaccine are not due only to pertussis organisms or pertussis components in the vaccine. *Vaccine* 9:699-702.

5 47. **Granstrom M., Granstrom P., Gillenius P., Askelof P.** (1985) Neutralizing antibodies to pertussis toxic in whooping cough. *J. Infect. Dis.* 151:646-649.

10 48. **Mosmann T.R., Schumacher J.H., Street N.F., Budd R., O'Garia A., Fong. T., Mond M.W., Moore W.M., Sner A., Fiorentino, D.F.** (1991) Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CO4 T-cells. *Imm. Rev.* 123:219-229.

10 49. **Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond H.W., Gredlin A., Coffman R. L.** (1986) Two types of murine helper T cell clone,. I. Definition according to profiles of cytokine activates and secreted proteins. *J.. Immunol.* 136:2348-2357.

15 50. **Mosmann T.R., Coffman R.L.** (1989) T_h1 and T_h2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173.

20 51. **Coffman R.L., Seymour B.W.P., Debman D.A., Hivaki D.D., Christiansen J.A., Shrader B. Chervinski H.M., Savelkoul H.P.J., Finkelman F.D., Bond M.W., Mosmann T.R.** (1988) The role of helper T cell products in mouse B-cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102:5-28.

52. **Romagnani S.** (1991) Human T_h1 and T_h2 subsets: Doubt no More. *Immunol. Today* 12: 256-257.

25 53. **Coffman R.L., Varkila K., Scott P., Chatelain R.** (1991) Role of cytokines in the differentiation of CD4 T cell subsets *in vivo*. *Imm. Rev.* 123:189-207.

54. **Bystryn J-C, Bart R.S., Livingston P., Kopf A.W.** (1974) Growth and immunogenicity of murine B-16 melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 63, 369-373.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una holotoxina pertussis genéticamente destoxificada en la que al menos uno de Arg⁹, Arg¹³, Trp²⁶, Arg⁵⁸
y Glu¹²⁹ de la subunidad S1 de la holotoxina se ha retirado o reemplazado, para la fabricación de un medicamento
inyectable que comprende dicha holotoxina pertussis genéticamente destoxificada, para proporcionar una respuesta
inmunitaria potenciada por adyuvante a al menos un antígeno no perteneciente al género *Bordetella* co-administrado
con dicha holotoxina pertussis genéticamente destoxificada mediante la misma ruta, siendo potenciadora dicha holoto-
xina pertussis genéticamente destoxificada para el suministro de dicha respuesta inmunitaria potenciada por adyuvante,
10 en ausencia de un adyuvante extrínseco, y siendo dicho al menos un antígeno no perteneciente al género *Bordetella* (i)
un antígeno de patógeno viral, (ii) un antígeno de patógeno bacteriano no perteneciente al género *Bordetella* o (iii) un
antígeno de patógeno parasitario no bacteriano y no viral.

15 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha holotoxina pertussis genéticamente destoxificada es
inmunoprotectora.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que múltiples aminoácidos se retiran y se
reemplazan en dicha holotoxina pertussis genéticamente destoxificada.

20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dichos múltiples aminoácidos son (S1) ARG⁹, GLU¹²⁹.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichos múltiples aminoácidos se reemplazan (S1) ARG⁹ por
LYS⁹ y GLU¹²⁹ por GLY¹²⁹.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nueva Formulación de Vacuna de Pertussis
Potenciación de Niveles de IgE en Suero

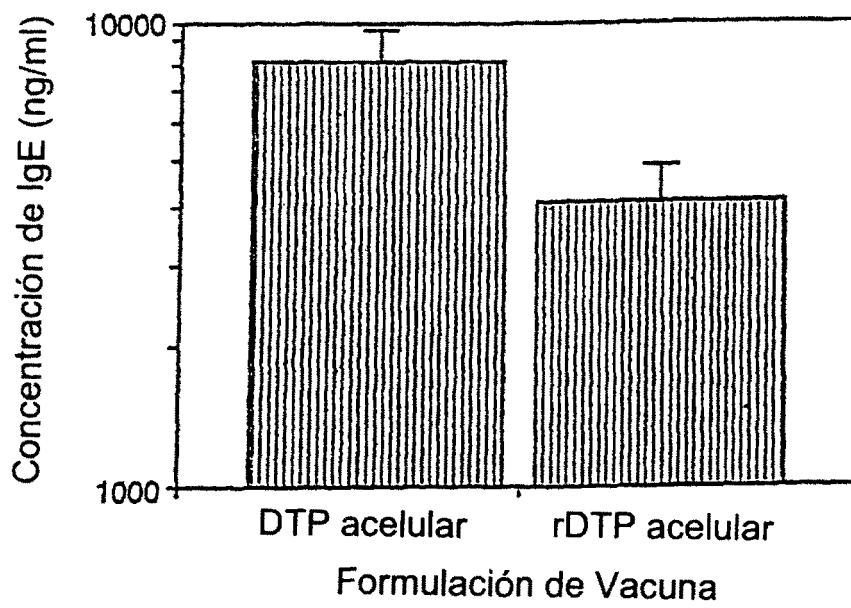


FIG.1.

Nueva Formulación de Vacuna de Pertussis
Respuestas de IgG Específicas para Antígeno

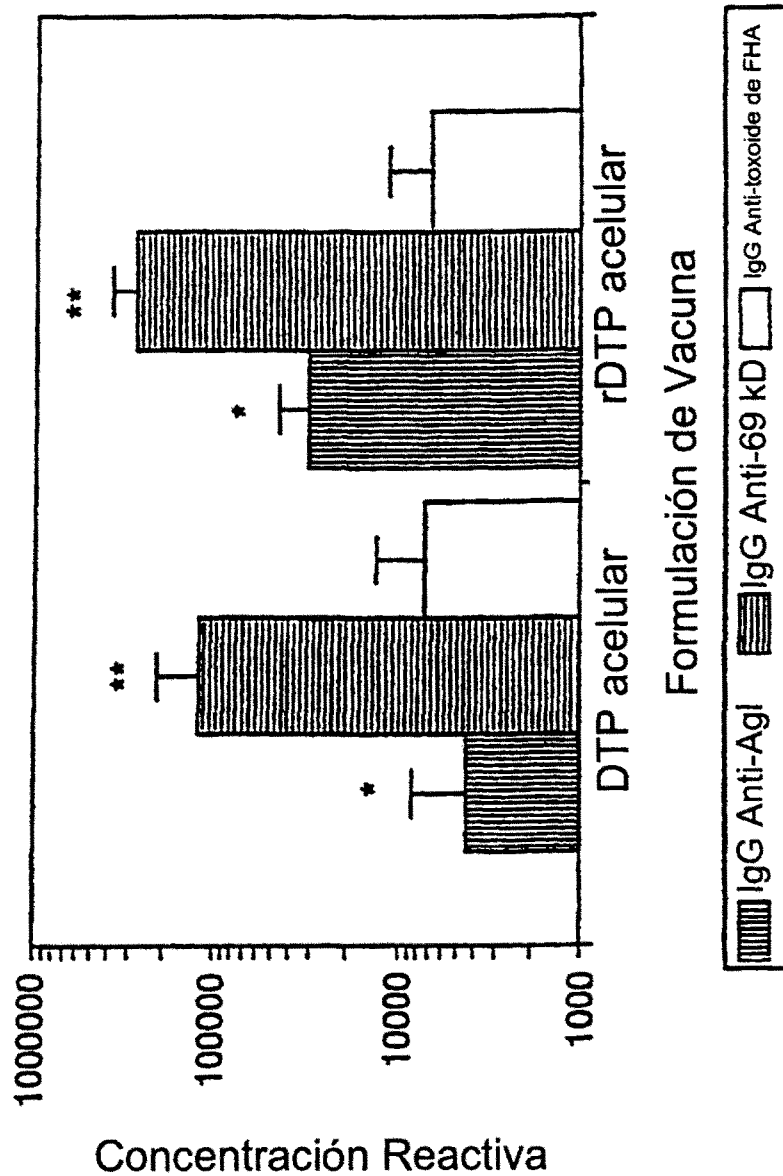


FIG.2.

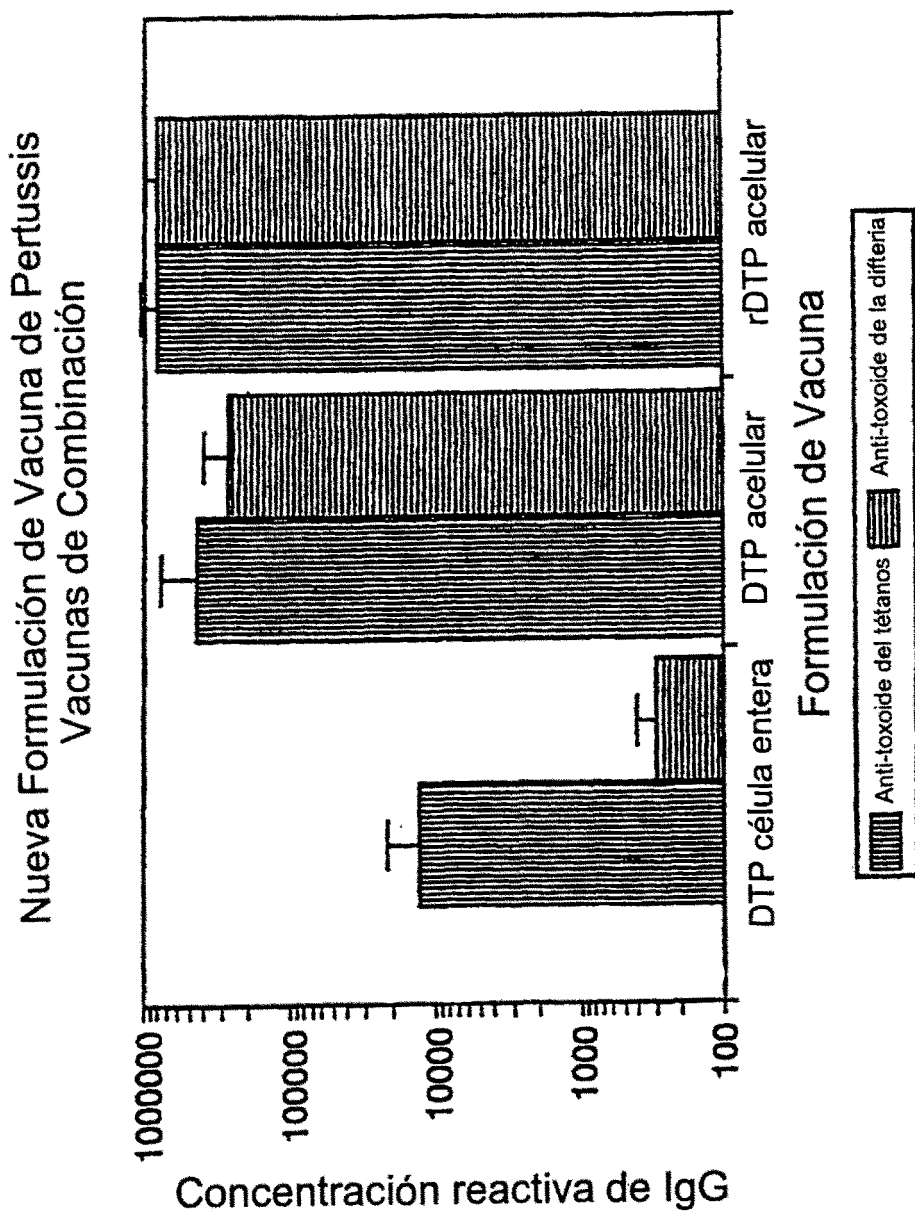


FIG.3.

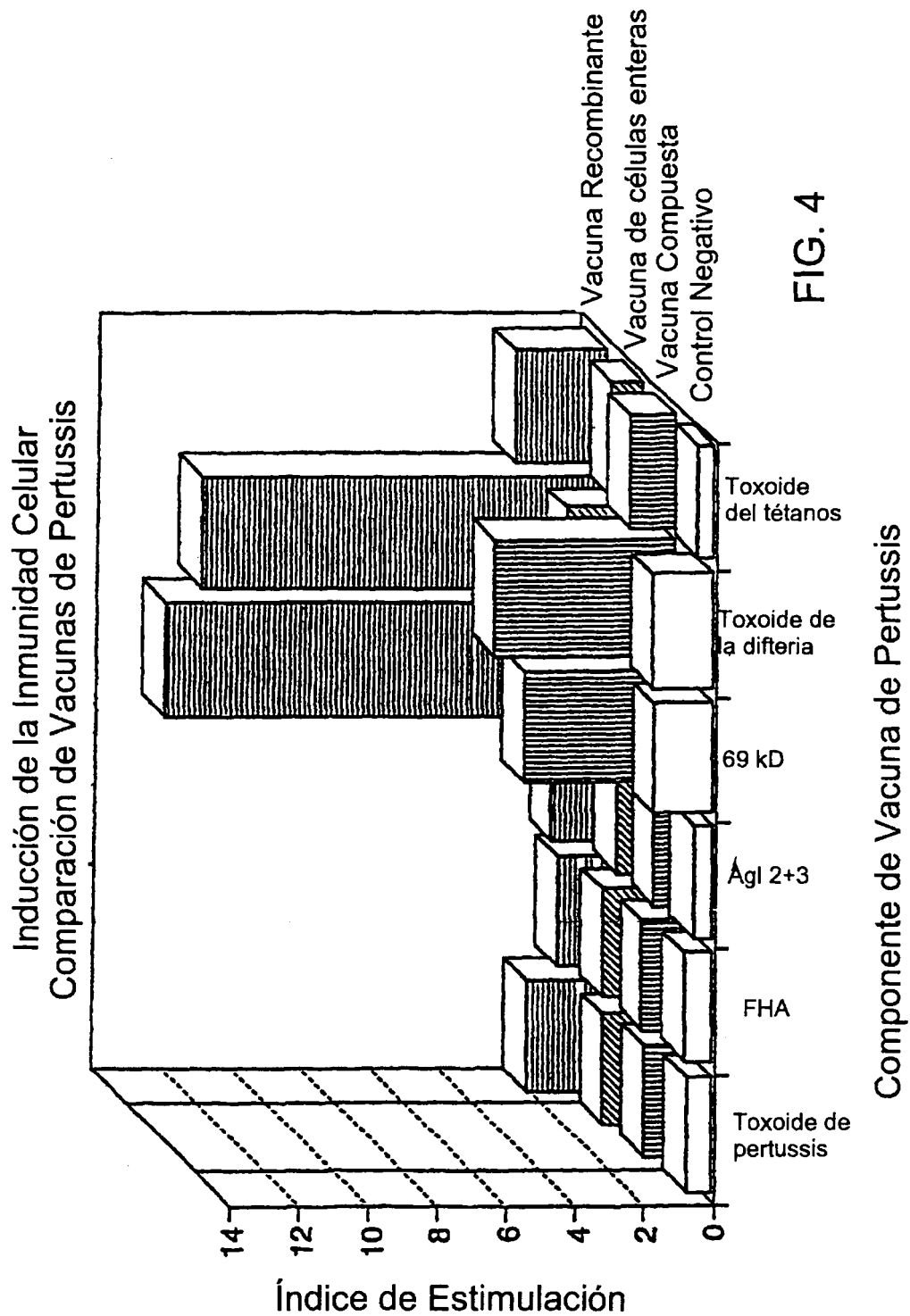


FIG. 4

Perfiles de Citoquina Murina
Potenciación de Fenotipos Th1

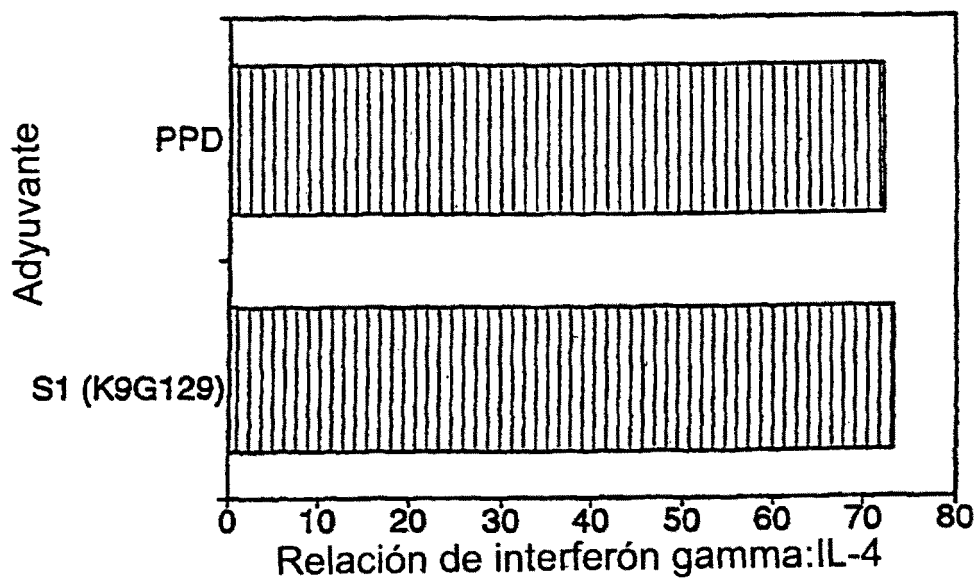


FIG.5.

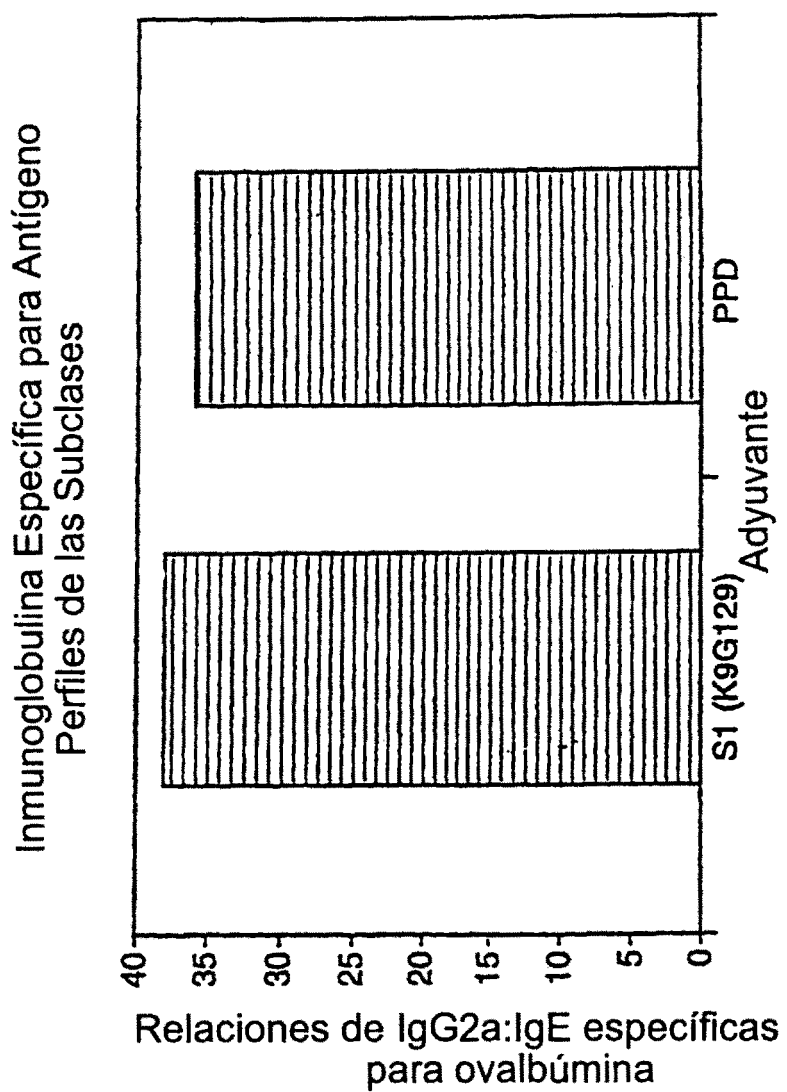


FIG.6.

Número de ratones libres de tumores a los 30 días (N=5)

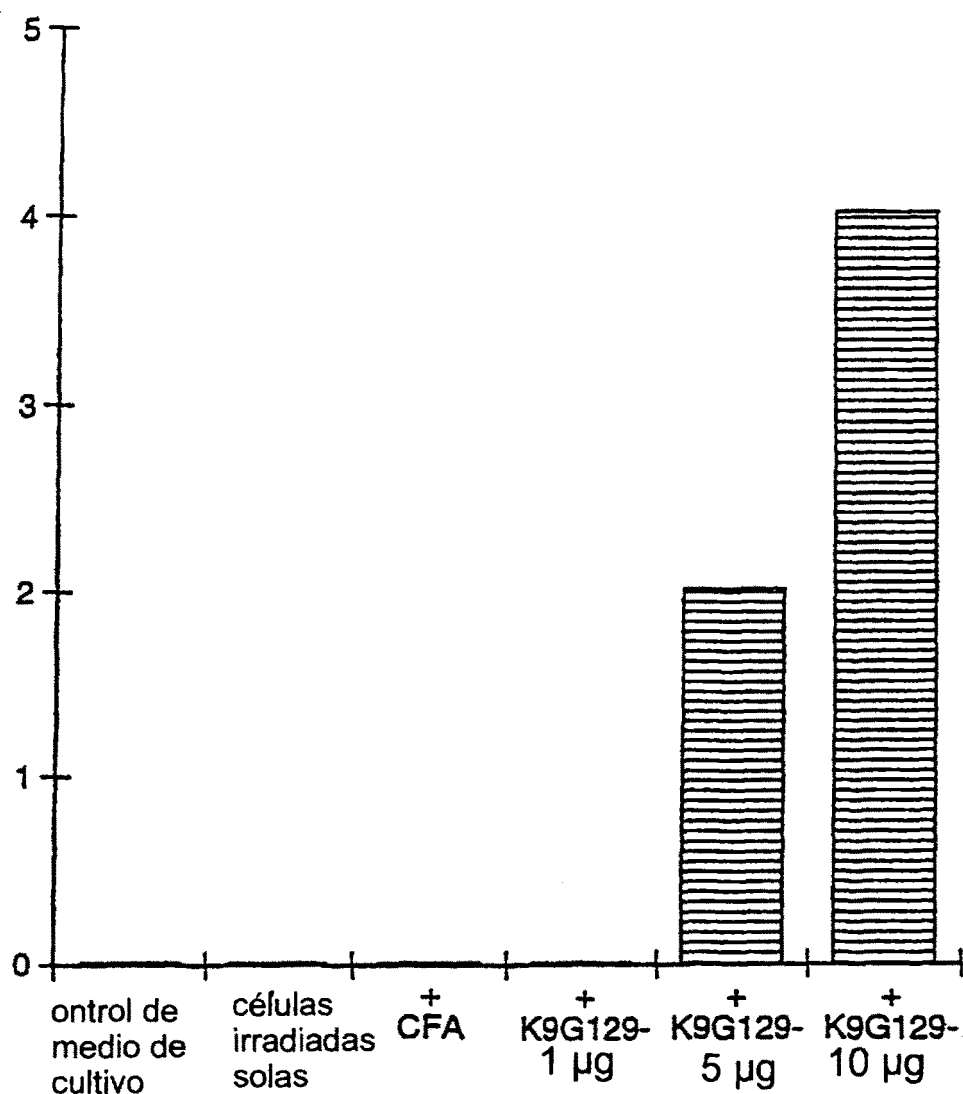


FIG.7.

Efecto como Adyuvante de K9G129

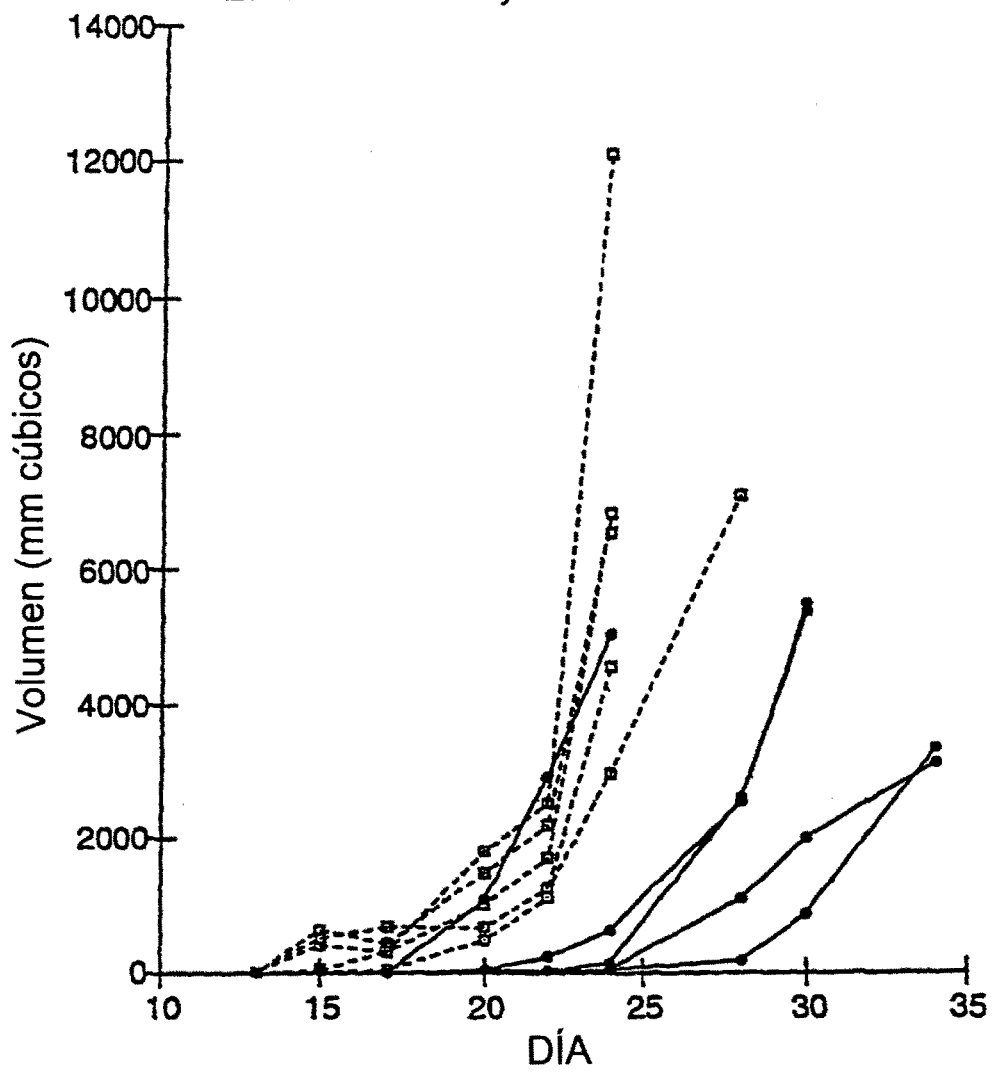


FIG.8.

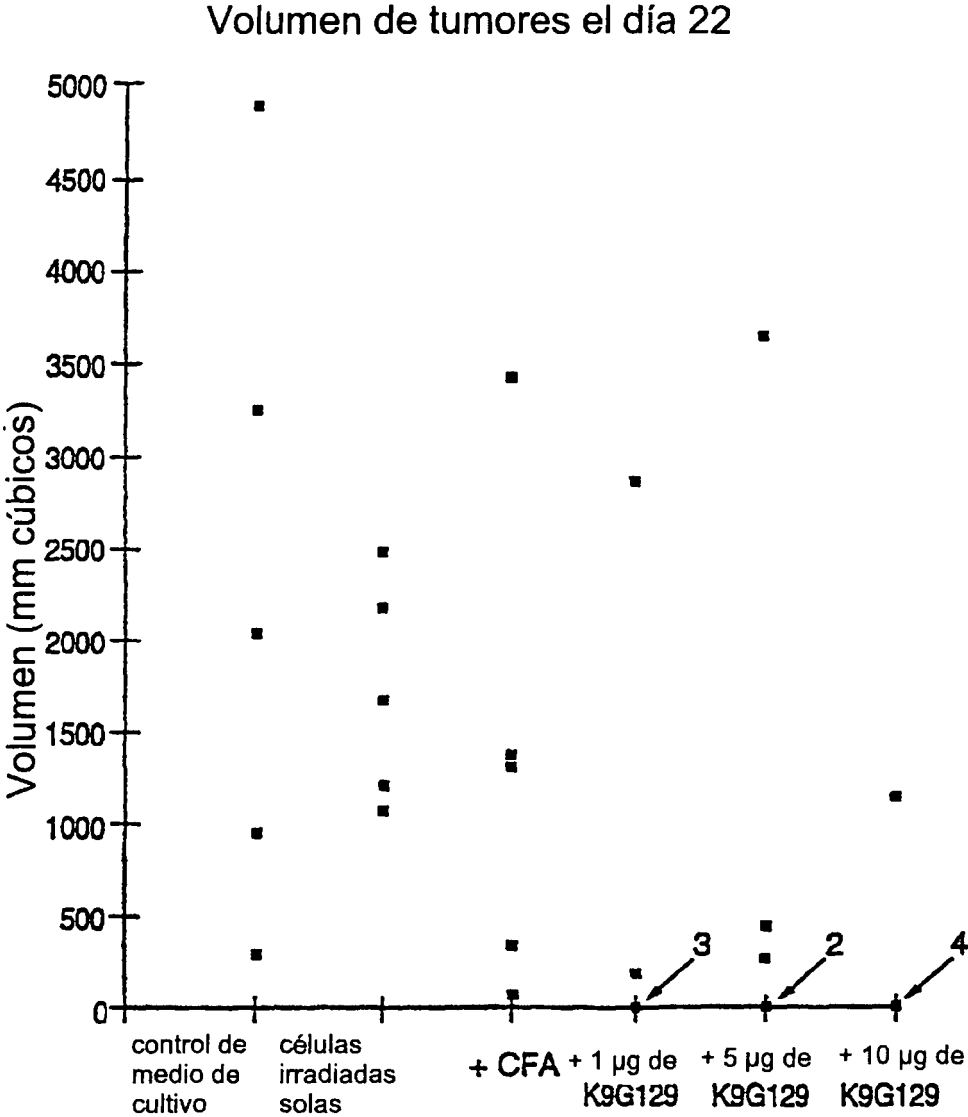


FIG.9.