



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 323 936**

51) Int. Cl.:
A61K 39/116 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/106 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Número de solicitud europea: **00962770 .4**
96) Fecha de presentación : **28.09.2000**
97) Número de publicación de la solicitud: **1223975**
97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.07.2002**

54) Título: **Vacunas DTPa mucósicas.**

30) Prioridad: **29.09.1999 GB 9923060**

45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.07.2009

45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.07.2009

73) Titular/es:
Novartis Vaccines and Diagnostics S.R.L.
Via Fiorentina 1
53100 Siena, SI, IT

72) Inventor/es: **Rappuoli, Rino y**
Pizza, Mariagrazia

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

ES 2 323 936 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas DTPa mucósicas.

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a vacunas DTP mucósicas, especialmente vacunas intranasales usadas como refuerzo.

10 **Antecedentes de la invención**

Bordetella pertussis es el agente causante de tos ferina. Ha estado disponible desde los años 1940 una vacuna de células completas inactivadas altamente eficaz, pero la preocupación sobre su seguridad, debido a la presencia de componentes celulares tóxicos, ha limitado su incorporación [1]. Se han producido por tanto vacunas de pertussis acelulares (Pa) que comprenden un pequeño número de antígenos de *B. pertussis* definidos, y se han aprobado para su uso en seres humanos [2].

Las vacunas de pertussis se administran usualmente a niños intramuscularmente en forma de una combinación DTP trivalente (difteria, tétanos, pertussis) en coadyuvante de alumbre. La vacunación intramuscular no es sin embargo la vía ideal de administración. Se prefieren las vacunas mucósicas (oral, intranasal, etc.) por dos razones [3]. En primer lugar, son más fáciles de administrar a gran escala, evitando la necesidad de equipo especializado y los problemas asociados con agujas. En segundo lugar, estimulan la inmunidad mucósica, mediada por IgA secretora. Como muchos organismos patógenos entran en el cuerpo a través de membranas mucosas, es deseable la inmunidad mucósica.

Se han descrito intentos para fabricar vacunas de pertussis mucósicas acelulares [por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9], pero los niveles de protección comunicados no eran comparables con la vacuna convencional o no se acercaban a los observados en antígenos con coadyuvante de alumbre dados parenteralmente. Se revelan vacunas DTP mucósicas en la referencia 13.

Hay por tanto necesidad de una vacuna de combinación DTP mucósica eficaz.

Revelación de la invención

La invención proporciona el uso de LT-K63 o LT-R72 para la fabricación de un medicamento para vacunación de refuerzo de un paciente contra tos ferina, difteria y tétanos, comprendiendo dicho medicamento un antígeno de difteria (D), un antígeno de tétanos (T) y un antígeno de pertussis acelular (Pa).

La invención proporciona además un medicamento que comprende (i) un antígeno de difteria (D), (ii) un antígeno de tétanos (T) y (iii) un antígeno de pertussis acelular (Pa), y (iv) LT-K63 o LT-R72, para uso en vacunación de refuerzo intranasal de un paciente contra tos ferina, difteria y tétanos.

Se ha encontrado que LT, que tiene un residuo de lisina en el aminoácido 63 ["LT-K63" - ref. 11], y LT, que tiene un residuo de arginina en el aminoácido 72 ["LT-R72" - ref. 12], aumentan la IgA del suero específica para antígeno, sIgA, y las respuestas local y sistémica de células T a DTPa. Se prefiere LT-K63, porque se ha encontrado ésta en un modelo de animal fiable de infección por *B. pertussis* para producir un alto nivel de protección (véase ref. 14), equivalente al generado con una vacuna DTPa suministrada parenteralmente formulada con alumbre.

El medicamento de vacuna mucósica de la invención es una vacuna intranasal. Está adaptado para administración intranasal, tal como mediante pulverización nasal, gotas nasales, gel o polvo [por ejemplo, 15].

El antígeno de pertussis acelular comprende preferiblemente holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentososa (FHA). Puede comprender además pertactina y, opcionalmente, aglutinógenos 2 y 3 [16, 17].

PT es una proteína tóxica y, cuando está presente en el antígeno de pertussis, está preferiblemente destoxificada. La destoxificación puede ser por medios químicos y/o genéticos. Un mutante destoxificado preferido es el mutante doble 9K/129G [2], al que se hace referencia en la presente memoria como "rPT".

El antígeno de difteria (D) es preferiblemente un toxoide de difteria, más preferiblemente el mutante CRM197 [10]. El antígeno de tétanos (T) es preferiblemente un toxoide de tétanos [18].

Pueden incluirse también antígenos no de DTP, preferiblemente los que no disminuyen la respuesta inmune contra los componentes de DTP [por ejemplo, ref. 19, que incluye un antígeno de HBV, y ref. 20].

La invención se usa para causar una respuesta de refuerzo en un paciente que ya se ha iniciado contra *B. pertussis*. La vacunación iniciadora puede haber sido por vía mucósica o parenteral.

Se apreciará que las referencias en el texto anterior a proteínas particulares (por ejemplo, pertactina, PT, etc.) abarcan sus variantes alélicas y mutantes funcionales. Abarcan también proteínas que tienen una identidad de secuencias

significativa con las proteínas de tipo natural. El grado de identidad es preferiblemente mayor del 50% (por ejemplo, 65%, 80%, 90% o más), calculado usando, por ejemplo, el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de separaciones afines con parámetros *penalidad de apertura de separaciones = 12* y *penalidad de extensión de separaciones = 1*. Pueden usarse también fragmentos inmunógenos de estas proteínas, porque proteínas más largas pueden incorporar las proteínas, variantes o fragmentos (por ejemplo, proteínas de fusión). En todos los casos, no obstante, la proteína (tanto si es de tipo natural, variante, mutante, fragmento o fusión) conservará sustancialmente la inmunogenicidad de tipo natural.

Las proteínas pueden prepararse, por supuesto, por diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de cultivo de células, síntesis química, etc.) y en diversas formas (por ejemplo, nativa, fusiones, etc.). Se preparan preferiblemente en forma sustancialmente pura o aislada (es decir, sustancialmente exenta de otras proteínas bacterianas o de células hospedantes con las que están asociadas normalmente en la naturaleza).

Los medicamentos vacunas según la invención serán típicamente profilácticos (es decir, para prevenir infección), pero también pueden ser terapéuticos (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección).

Los medicamentos vacunas de la invención comprenderán típicamente, además de los componentes definidos en las reivindicaciones 1 o 2, “vehículos aceptables farmacéuticamente”, que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos polímeros, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivas. Tales vehículos son muy conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. Las vacunas pueden contener también diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras de pH y similares.

Las composiciones inmunógenas usadas como vacunas comprenden una cantidad eficaz inmunológicamente de antígeno, así como cualquier otro de los componentes mencionados antes, según se necesite. Por “cantidad eficaz inmunológicamente” se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica del doctor que trata y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante pruebas rutinarias. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. La vacuna puede administrarse conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 muestra respuestas de células T en bazo a una vacuna Pa intranasal coadyuvada con LT-K63. El estímulo de células T usado en este ensayo fue: PT (en negro), FHA (rayado diagonal) o bacteria de *B. pertussis* (líneas horizontales). La vacuna Pa (FHA+rPT) se suministró con o sin coadyuvante LT-K63, con o sin anestesia de halotano ligera. PBS fue un testigo. La Figura 2 muestra datos similares para coadyuvante LT-R72, en (A) bazo (B) nódulo linfático torácico (C) nódulo linfático cervical superficial. Se usó como testigo positivo PMA/CD3 (sin rayado).

La Figura 3 muestra respuesta de anticuerpos para las mismas vacunas - 3A muestra resultados usando coadyuvante LT-K63, y 3B muestra resultados usando coadyuvante LT-R72. Las barras en negro muestran respuestas anti-PT; las barras en blanco muestran respuestas anti-FHA.

La Figura 4 muestra el efecto de dosis de toxina en el efecto coadyuvante de los coadyuvantes LT mutantes.

La Figura 5 muestra la cinética de eliminación de *B. pertussis* después de la inmunización con las mismas vacunas como en las Figuras 1 & 2 - 5A muestra resultados usando LT-K63 y 5B muestra resultados usando LT-R72. Los resultados son la media de *B. pertussis* viable para pulmones individuales de cuatro ratones por punto de tiempo y por grupo experimental.

La Figura 6 muestra las respuestas de IgA e IgG contra los cinco antígenos en una vacuna DTPa, comparando (i) coadyuvante alumbre y administración intramuscular (barras en blanco) y (ii) coadyuvante LT-K63 y administración intranasal (barras en negro). La Figura 7 compara las respuestas de células T para las mismas vacunas, y la Figura 8 muestra la cinética de eliminación.

La Figura 9 muestra proliferación de células T (medida como ³H-CPM) contra los componentes D (inferior), T (intermedio) y Pa (superior) de vacunas DTPa administradas usando 5 regímenes diferentes de iniciación y refuerzo. Se muestran también las respuestas de citoquina de células T contra el componente Pa (Figura 10), el componente D (Figura 11) y el componente T (Figura 12). La Figura 13 muestra los títulos de IgG de suero (superior) e IgA de homogenado de pulmón (inferior) (log₁₀) en respuesta a los cinco antígenos definidos en la mezcla DTPa. La Figura

ES 2 323 936 T3

14 muestra los anticuerpos neutralizantes anti-DT importantes funcionalmente. La Figura 15 cinética de eliminación para los cinco regímenes.

5 Cuando se calculó, se indica significación estadística (ensayo de Student) frente a Pa solo por * ($P < 0,05$) o ** ($P < 0,01$).

Modos para realizar la invención

Materiales & procedimientos fundamentales

10 Las ratones usados en los siguientes ejemplos fueron ratones Balb/c hembras, de 6-8 semanas de edad, de Harlan UK, y se alojaron según los reglamentos del Irish Department of Health.

15 *Respuestas de células T.* Se inmunizaron ratones a las 0 y 4 semanas. A las 6 semanas, se separaron nódulos linfoides cervicales superiores, de bazo, y nódulos linfoides mediastinales (torácicos) posteriores y se evaluaron las respuestas inmunes. Se cultivaron por triplicado células de bazo de ratones individuales o células de nódulos linfáticos agrupadas (2×10^6 células/ml) de ratones simples o inmunizados en RPMI suplementado con 8% de FCS a 37°C con bacterias de *B. pertussis* destruidas con calor (80°C durante 30 minutos) (10^6 o 10^7 células/ml), rPT inactivada con calor (1-5 $\mu\text{g/ml}$) o FHA (1-5 $\mu\text{g/ml}$). Se usaron como testigo positivo miristato acetato de forbal (PMA) + CD3 anti-ratón; se usó como testigo negativo sólo medio. En experimentos usando DTPa, se ensayaron también respuestas contra PRN, TT o CRM197 (1-5 $\mu\text{g/ml}$). Se separaron sobrenadantes después de 72 horas y se determinó por inmunoensayo la concentración de IFN- γ (indicativa de respuesta de Th1) e IL-4 & IL-5 (indicativas ambas de respuesta de Th2) como se describe en la referencia 22. Se valoró proliferación de células T después de 4 días de cultivo por absorción de ^3H -timidina, también como se describe en la referencia 22. Los resultados se expresan como cuentas medias por minuto o concentración media de citoquina para la concentración óptima de antígeno en ensayos realizados por triplicado en células de bazo individuales o células de nódulos linfáticos agrupadas de cuatro a cinco ratones.

20 Ensayos de anticuerpos. Se determinaron por ELISA los niveles de IgG específica para antígeno en el suero de ratones testigo e inmunizados. Se usaron antígenos purificados (FHA, PT, TT y DTP; 1,0 $\mu\text{g/ml}$) para revestir las placas de ELISA. Las placas se bloquearon con proteína de leche, se añadieron después muestras de suero diluidas en serie, y se detectó el anticuerpo unido mediante conjugado de fosfatasa alcalina de IgG anti-ratón (específica de Fc). Se detectó por ELISA IgA específica de antígeno en pulmones. Los pulmones se homogeneizaron en RPMI suplementado con 8% de FCS que contenía inhibidor de proteasa de PMSF 0,1 mM. Las placas de ELISA se revistieron con antígeno como para el ensayo de IgG y se añadió homogenado de pulmón diluido en serie. El anticuerpo unido se detectó con 25 IgA anti-ratón de cabra, seguido por conjugado de fosfatasa alcalina de IgG anti-cabra de mono. Los resultados se expresan como títulos de punto final, calculados por regresión de la parte recta de una curva de densidad óptica frente a dilución de suero u homogenado de pulmón hasta un corte de 2 desviaciones típicas por encima de los valores testigo de fondo para suero u homogenados de pulmón de ratones simples.

40 1) Mutantes de LT son coadyuvantes intranasales para Pa

Se prepararon dos vacunas Pa. El componente antígeno en cada vacuna fue FHA (2,5 $\mu\text{g/dosis}$) + rPT (5,0 $\mu\text{g/dosis}$), con antígenos preparados como se describe en la referencia 23.

45 La primera vacuna (Figura 1) se coadyuvó con LT-K63 (10 $\mu\text{g/dosis}$), mientras que la segunda vacuna (Figura 2) se coadyuvó con LT-R72 (1 $\mu\text{g/dosis}$). Una vacuna testigo consistió en FHA + rPT únicamente. Los coadyuvantes se prepararon como se describe en las referencias 24 y 25.

50 Los ratones se inmunizaron a las 0 y 4 semanas con la dosis de vacuna resuspendida en 25 μl y aplicada a las fosas nasales con una micropipeta o, tras anestesia ligera con halotano, con la dosis de vacuna resuspendida en 50 μl y aplicada a las fosas nasales con una micropipeta. Las respuestas de células T a *B. pertussis* destruido, PT inactivada por calor y FHA se midieron en bazo y nódulos linfáticos torácico y cervical a las 6 semanas (Figuras 1 & 2).

55 Se detectaron proliferación de células T y producción de citoquina fuertes para las vacunas Pa con coadyuvante. Como contraste, los bazos y los nódulos linfáticos locales de ratones inmunizados intranasalmente con el testigo no generaron respuestas de células T específicas para *B. pertussis* significativas. Las respuestas positivas al estímulo policlonal (PMA + anti-CD3) confirma que estas células T eran capaces de responder *in vitro*.

60 La Figura 3 muestra que los coadyuvantes LT mutantes también aumentaron la producción de anticuerpos local y sistémica tras el suministro intranasal de Pa. La inmunización con el testigo generó respuestas de IgG de suero e IgA de pulmón anti-PT y anti-FHA débiles e inconsecuentes. Como contraste, la formulación de los mismos antígenos con LT-R72 o LT-K63 produjo IgG de suero e IgA de pulmón consecuentemente fuertes específicas para PT y FHA y aumentaron también significativamente respuestas de IgA, especialmente cuando se administró la vacuna bajo anestesia.

65 La presencia de los mutantes de LT produjo así mejores respuestas de células T y anticuerpos. Pueden aumentar la eficacia protectora de una Pa suministrada nasalmente, y son por tanto coadyuvantes intranasales eficaces para vacunas acelulares.

ES 2 323 936 T3

2) Efecto de la actividad de enzimas y la dosis de toxina en la capacidad coadyuvante

Los perfiles de citoquina obtenidos en el ejemplo 1 muestran que la actividad de ribosilación de ADP de las toxinas juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune. El coadyuvante K63, que está exento de cualquier actividad de enzimas tóxicas, aumentó la producción de IL-4, IL-5 e IFN- γ , característica de un perfil de Th1-Th2 (es decir, Th0) mezcladas. Como contraste, 1,0 μg del coadyuvante R72, que conserva actividad de enzimas tóxicas parcial, pareció aumentar selectivamente células Th2.

En experimentos que comparaban directamente la capacidad coadyuvante de las toxinas *in vivo*, se inmunizaron ratones BALB/c con Pa formulado con 1 o 10 μg de LTK63 o LTR72 como coadyuvante, y se valoraron las respuestas inmunes resultantes (Figura 4). La inmunización intranasal con Pa testigo generó respuestas de células T débiles, mientras que la adición de 1 μg de LTK63 aumentó la proliferación, así como la producción de LFN- γ e IL-5, por células del bazo y nódulos linfoides, en respuesta a FHA o *B. pertussis* destruida. El aumento de la dosis a 10 μg de LTK63 produjo aumentos adicionales moderados de la proliferación y producción de IFN- γ . 1,0 μg de LTR72 aumentó significativamente las respuestas de Th2, con niveles elevados de producción de IL-4 e IL-5 inducida por antígeno en comparación con los observados con Pa solo. El LT de tipo natural (1,0 μg) aumentó también significativamente la producción de IL-4 e IL-5, pero el efecto no fue tan drástico como el observado con LTR72. Además, los ratones que recibieron 1,0 μg de LTR72 tenían títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-FHA y anti-PT significativamente más altos que los inmunizados usando LTK63 o LT de tipo natural (datos no mostrados). Un aumento de la dosis de LTR72 de 1,0 a 10 μg produjo un aumento de los niveles de IFN- γ y niveles más bajos de IL-4 e IL-5.

Así, la actividad de enzimas y la dosis de la toxina parecen afectar al perfil de citoquina de las células T específicas para antígeno inducidas. Las cantidades de trazas de actividad de ribosilación de ADP presentes en dosis bajas de LTR72 son suficientes para modular el perfil de citoquina a Th2 y actuar como un coadyuvante activo para respuestas de anticuerpos. A la inversa, el efecto coadyuvante de LTK63, que es mediado por el efecto de unión del complejo AB, es empujado más hacia el subtipo Th1. Además, a mayores dosis de LTR72, la actividad de unión de AB puede pesar más que la actividad de enzimas, produciendo aumento de inducción de células Th1 así como Th2.

3) Protección contra infección por pertussis

La eficacia de la vacuna en pruebas clínicas humanas se ha correlacionado con la protección de ratones inmunizados en el modelo de reto respiratorio descrito en la referencia 22. Se usó por tanto este modelo para valorar Pa suministrada intranasalmente formulada con los coadyuvantes LT, con el fin de predecir la eficacia humana.

Se desarrolló *B. pertussis* W28 fase I en condiciones de agitación a 37°C en medio líquido de Stainer-Scholte. Las bacterias de un cultivo de 48 horas se resuspendieron con una concentración de aproximadamente 2×10^{10} células/ml en solución salina fisiológica que contenía 1% de caseína. El inóculo de reto se administró a ratones durante un período de 15 min mediante un nebulizador, seguido por descanso en la cámara durante 15 min más. Se sacrificaron grupos de 4 ratones a los 0, 3, 7, 10 y 14 días, y se valoró el número de *B. pertussis* viables en los pulmones. Los pulmones se separaron aseptícamente de ratones infectados y se homogeneizaron en 1 ml de solución salina fisiológica estéril con 1% de caseína en hielo. Se mancharon por triplicado placas de agar de Bordet-Genou con partes alícuotas de 100 μl de homogenado no diluido o diluido en serie de pulmones individuales, y se valoró el número de colonias después de 5 días de incubación (Figura 5).

Las formulaciones de Pa con coadyuvante proporcionaron niveles de protección significativamente mayores que los conseguidos con antígenos solubles solos. El coadyuvante LT-K63 generó marginalmente mejor protección que LT-R72. El suministro nasal de Pa con LT-R72 en 25 μl (sin anestésico) dio marginalmente mejor protección que la misma vacuna en 50 μl (con anestésico). Ninguna de estas dos diferencias fue significativa.

Los niveles de protección mostrados en la Figura 5 superaron los observados con una Pa de dos componentes (25 μg de FHA + 25 μg de PT destoxificada químicamente en alumbre [16, 22]) suministrada perenteralmente convencional. La extrapolación de la curva de correlación muestra un mejor índice de actividad, sugiriendo eficacia clínica superior en seres humanos.

4) Eficacia de DTPa usando LT-K63

Las vacunas de pertussis se administran usualmente a niños intramuscularmente en forma de una combinación DTP trivalente en coadyuvante de alumbre. Para valorar la eficacia de la vacunación intranasal, se coadyuvó por tanto con alumbre una vacuna DTPa (300 μg /dosis, volumen 300 μl) para administración intramuscular, para comparación directa con la vacuna intranasal coadyuvada con LT-K63 (10 μg de coadyuvante/dosis, volumen 40 μl). El componente Pa de la vacuna incluía 5 μg de rPT, 2,5 μg de FHA y 2,5 μg de pertactina; el componente T era 10 μg de toxoide de tétanos; el componente D era 10 μg de CRM 197.

La vacuna intranasal aumentó las respuestas inmunes celular y humoral a tétanos y difteria así como antígenos de pertussis (Figuras 6 & 7). Los niveles de IgG del suero usando la vacuna intranasal fueron equivalentes a los observados usando la vacuna intramuscular, pero la inmunización mucósica aumentó ventajosamente las respuestas de IgA locales.

ES 2 323 936 T3

Significativamente, la eficacia protectora de la vacuna coadyuvada con LT-K63 igualó a la de la vacuna coadyuvada con alumbre “estándar”, aunque la cinética de eliminación varió ligeramente (Figura 8). Esta es la primera revelación de una formulación de DTPa combinada suministrada mucóticamente que es capaz de generar un nivel de protección frente a la infección por *B. pertussis* equivalente al observado con los mismos antígenos adsorbidos en alumbre y administrados parenteralmente.

5) Iniciación intramuscular y refuerzo intranasal

La vacuna DTPa se usó también en un experimento de iniciación-refuerzo.

Dos grupos de 22 ratones se inmunizaron intramuscularmente a las 0 y 4 semanas con DTPa en alumbre o PBS (testigo). Un grupo adicional de 22 ratones se inmunizó intranasalmente a las 0 y 4 semanas con la vacuna coadyuvada con LT-K63. Dos grupos adicionales de 22 ratones se inmunizaron con la formulación de alumbre intramuscular en la semana 0 y la formulación intranasal (con o sin coadyuvante LT-K63) en la semana 4:

Grupo	Dosis de iniciación	Dosis de refuerzo
1	PBS	PBS
2	DTPa (alumbre) intramuscular	DTPa (alumbre) intramuscular
3	DTPa (alumbre) intramuscular	DTPa (PBS) intramuscular
4	DTPa (alumbre) intramuscular	DTPa (LT-K63) intranasal
5	DTPa (LT-K63) intranasal	DTPa (LT-K63) intranasal

Cinco ratones de cada grupo se sacrificaron en la semana 6, y se midieron las respuestas inmunes de células del suero, pulmones y bazo. Los ratones restantes se sometieron al modelo de infección. Un ratón de cada grupo el día 0 y cuatro ratones de cada grupo los días 3, 7, 10 y 14 se sacrificaron, y se midieron sus cuentas de UFC de sus pulmones.

La proliferación de células T (Figura 9) fue débil para todos los grupos para células de bazo estimuladas con los antígenos de *pertussis in vitro*. No obstante, las células proliferaron en respuesta al testigo positivo (PMA+CD3). Las respuestas de proliferación a toxoide de tétanos *in vitro* eran significativamente más fuertes en ratones reforzados intranasalmente (después de iniciación intramuscular) cuando se usó como coadyuvante LT-K63. La proliferación *in vitro* más fuerte contra el componente de difteria se vio en los ratones inmunizados intranasalmente dos veces.

Las respuestas de citoquina a antígenos de pertussis (Figura 10) mostró la producción de IL-5 e IFN- γ en todos los grupos, indicando iniciación de poblaciones de Th1 y Th2 *in vivo*. La producción de IL-4 se limitó a grupos inmunizados de la misma forma ambas veces. La iniciación y el refuerzo con la formulación de LT-K63 intranasal parece dar una respuesta de Th2 más fuerte (mayores IL-4 e IL-5) que los grupos iniciados intramuscularmente.

Las respuestas de citoquina contra el antígeno de difteria (Figura 11) se restringieron a IL-4 e IL-5, con poco o nulo IFN- γ detectado para cada grupo. El refuerzo intranasal con DTPa produce así la iniciación de células TH2 *in vivo*. La respuesta de Th2 más fuerte se generó de los ratones inmunizados intranasalmente dos veces con el coadyuvante LT-K63. Como contraste, dos inyecciones intramusculares no dieron respuestas de IL-4 o IL-5 detectables en el bazo, ni de IFN- γ .

Las respuestas de citoquina contra el antígeno del tétanos (Figura 12) mostraron la producción de IL-4, IL-5 y bajos niveles de IFN- γ en todos los ratones, indicando una respuesta de Th1/Th2 mezclada. Los niveles de IL4 e IL5 fueron sin embargo significativamente más altos en grupos reforzados intranasalmente con el coadyuvante LT-K63, en comparación con el refuerzo intranasal sin coadyuvante o el refuerzo intramuscular.

Las respuestas de IgG contra TT, DT y PTN (Figura 13) no mostraron diferencias de títulos significativas entre los diversos grupos. Los títulos anti-PT y anti-FHA fueron ligeramente más altos en grupos iniciados y reforzados con DTPa intramuscularmente que en grupos reforzados intranasalmente (con o sin coadyuvante LT-K63). No se detectaron IgG anti-FHA, aunque esto no está de acuerdo con los resultados presentados antes. Los niveles de IgA (Figura 13) mostraron que la iniciación intramuscular y el refuerzo intranasal usando el coadyuvante LT-K63 generaron títulos similares para muchos antígenos a iniciación y refuerzo intranasales, aunque los niveles anti-PT eran significativamente más bajos. El refuerzo intranasal sin el coadyuvante LT-K63 generó niveles de IgA más bajos, particularmente para DHA y PTN.

El análisis de anticuerpos neutralizantes anti-DT importantes funcionalmente en sueros de ratones (Figura 14) demostró que la iniciación intramuscular y el refuerzo intranasal usando LT-K63 produjo los mayores niveles.

ES 2 323 936 T3

El modelo de protección mostró que se obtenían niveles similares de protección en las inmunizaciones intranasal doble e intramuscular doble. Mientras que la cinética de las curvas de eliminación (Figura 15) varía, se eliminó eficazmente *B. pertussis* en ambos casos, con cuentas de UFC por debajo de 1 (\log_{10}) 14 días después del reto. Muchos adultos han recibido actualmente una vacunación de pertussis intramuscular. Ésta está representada por la iniciación intramuscular en este ejemplo. Los datos muestran que el refuerzo intranasal con coadyuvante LT-K63 es un método eficaz de vacunación.

Este ejemplo muestra también que LT-K63 es un coadyuvante muy eficaz para el suministro de 1X CRM197. Se ha informado del aumento intranasal contra este antígeno usando quitosán, aunque esto requería tres inmunizaciones para respuestas de IgA y células T moderadas. Como contraste, LT-K63 era capaz de inducir fuertes respuestas de IgG, IgA, IL-4 e IL-5 después de sólo dos inmunizaciones intranasales. Se generaron también niveles similares de anticuerpos neutralizantes anti-DT como con quitosán.

Se entenderá que la invención se ha descrito antes sólo a modo de ejemplo y que pueden hacerse modificaciones permaneciendo dentro del alcance de la invención.

Referencias

1. Center for Disease Control and Prevention (1997) *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 45:RR1-RR25
2. Rappuoli (1997) *Nature Medicine* 3:374-376.
3. Walker (1994) *Vaccine* 12:387-400.
4. Cahill et al. (1995) *Vaccine* 13:455-462.
5. Cahill et al. (1993) *FEMS Microbiology Letters* 107:211-216.
6. Jones et al. (1996) *Infect. Immun.* 64:489-494.
7. Shahin et al. (1992) *Infect. Immun.* 60:1482-1488.
8. Shahin et al. (1995) *Infect. Immun.* 63:1195-1200.
9. Guzman et al. (1993) *Infect. Immun* 61:573-579.
10. Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
11. WO93/13202.
12. WO98/18298.
13. WO93/21950.
14. Ryan et al. (1999) *Immunol Lett*, 69:59.
15. Almejda & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
16. Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
17. Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
18. Wassilak & Orenstein, Capítulo 4 de *Vaccines* (eds. Plotkin & Mortimer), 1988.
19. WO98/24148.
20. Hauser et al. (1998) *Dev Biol Stand* 95:251-255.
21. Donnelly et al. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
22. Mills et al. (1998), *Infect. Immun.* 66:2594-2602.
23. Podda et al. (1991) *Vaccine* 9:741-745.
24. Douce et al. (1995) *PNAS USA* 92:1644-1648.
25. Giulani et al. (1998) *J. Exp. Med.* 187:1-10.

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de LT-K63 o LT-R72 para la fabricación de un medicamento intranasal para vacunación de refuerzo de un paciente contra tos ferina, difteria y tétanos, comprendiendo dicho medicamento un antígeno de difteria (D), un antígeno de tétanos (T) y un antígeno de pertussis acelular.

10 2. Un medicamento que comprende (i) un antígeno de difteria (D), (ii) un antígeno de tétanos (T) y (iii) un antígeno de pertussis acelular (Pa), y (iv) LT-K63 o LT-R72, para uso en vacunación de refuerzo intranasal de un paciente contra tos ferina, difteria y tétanos.

3. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento de la reivindicación 2, en el que el antígeno de pertussis acelular comprende holotoxina de pertussis destoxificada y hemaglutinina filamentosa.

15 4. El uso o medicamento de la reivindicación 3, en el que el antígeno de pertussis acelular comprende además pertactina.

20 5. El uso o medicamento de las reivindicaciones 3 o 4, en el que la holotoxina de pertussis destoxificada es un mutante doble 9K/129G.

6. El uso o medicamento de cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento incluye un toxoide de difteria y un toxoide de tétanos.

25 7. El uso o medicamento de cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento comprende además un antígeno no de DTPa.

8. El uso o medicamento de cualquier reivindicación precedente, en el que el paciente es un niño.

30 9. El uso o medicamento de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacunación iniciadora es por vía parenteral.

10. El uso o medicamento de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacunación de iniciación es por vía mucósica.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA I

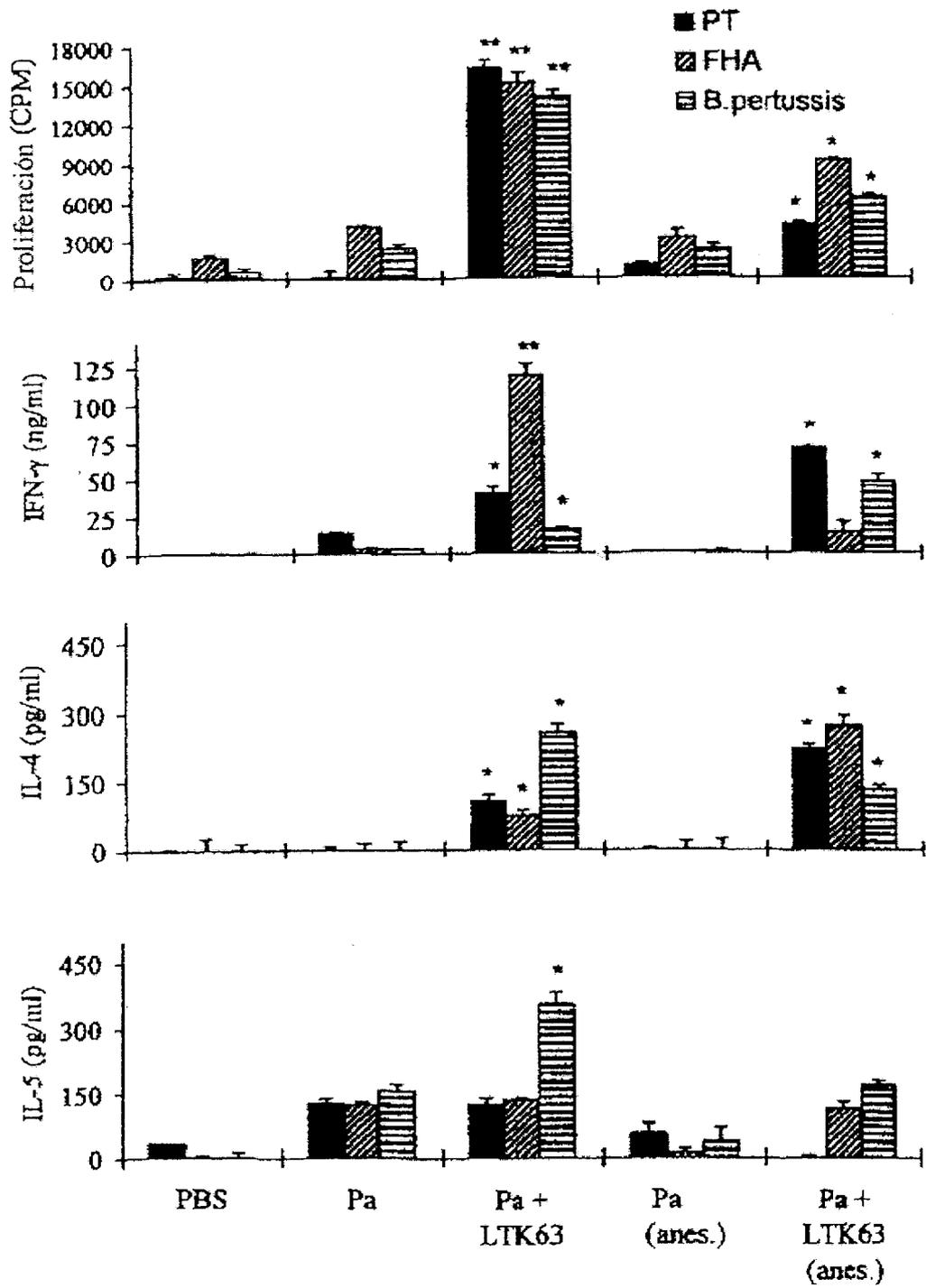


FIGURA 2A

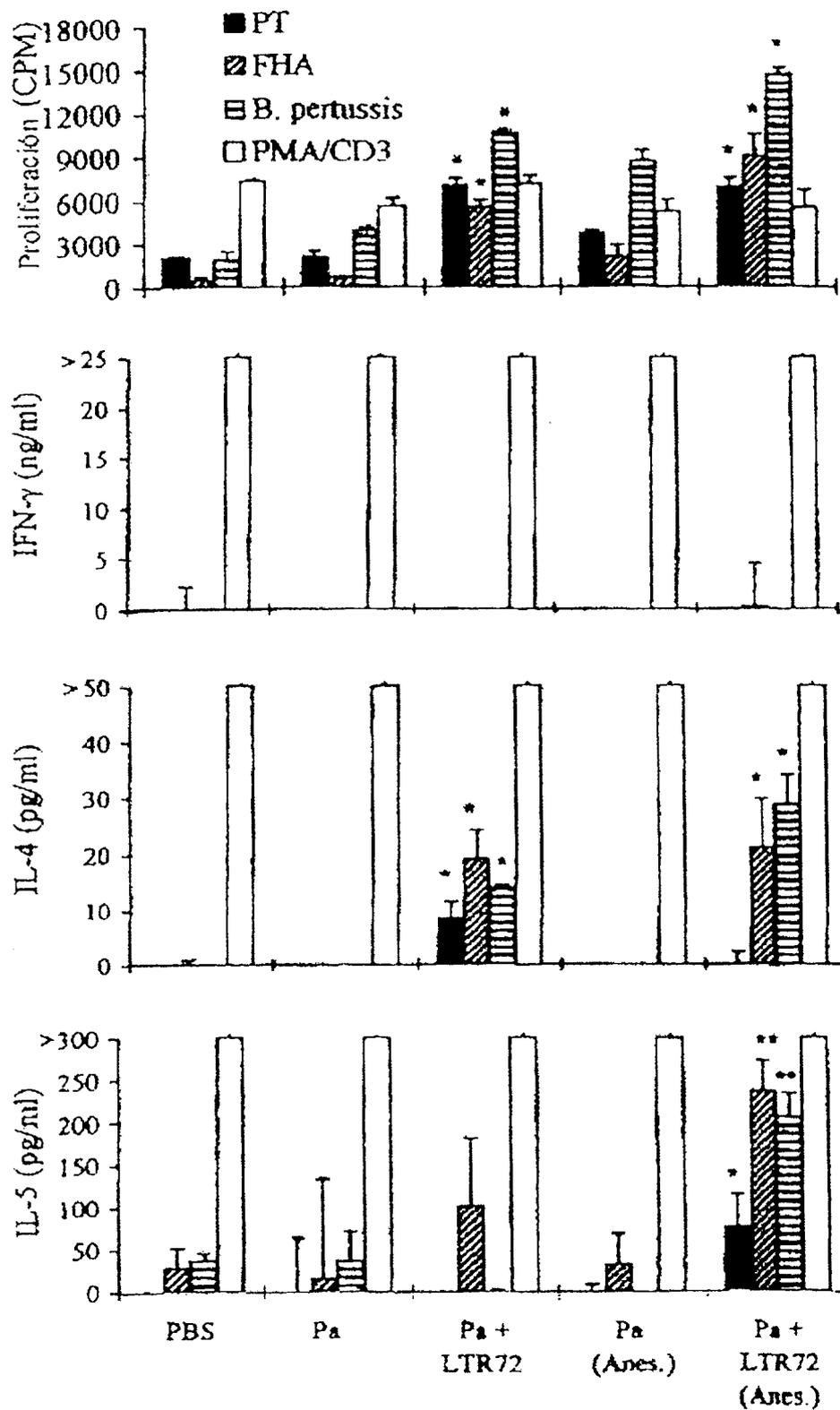


FIGURA 2B

FIGURA 2C

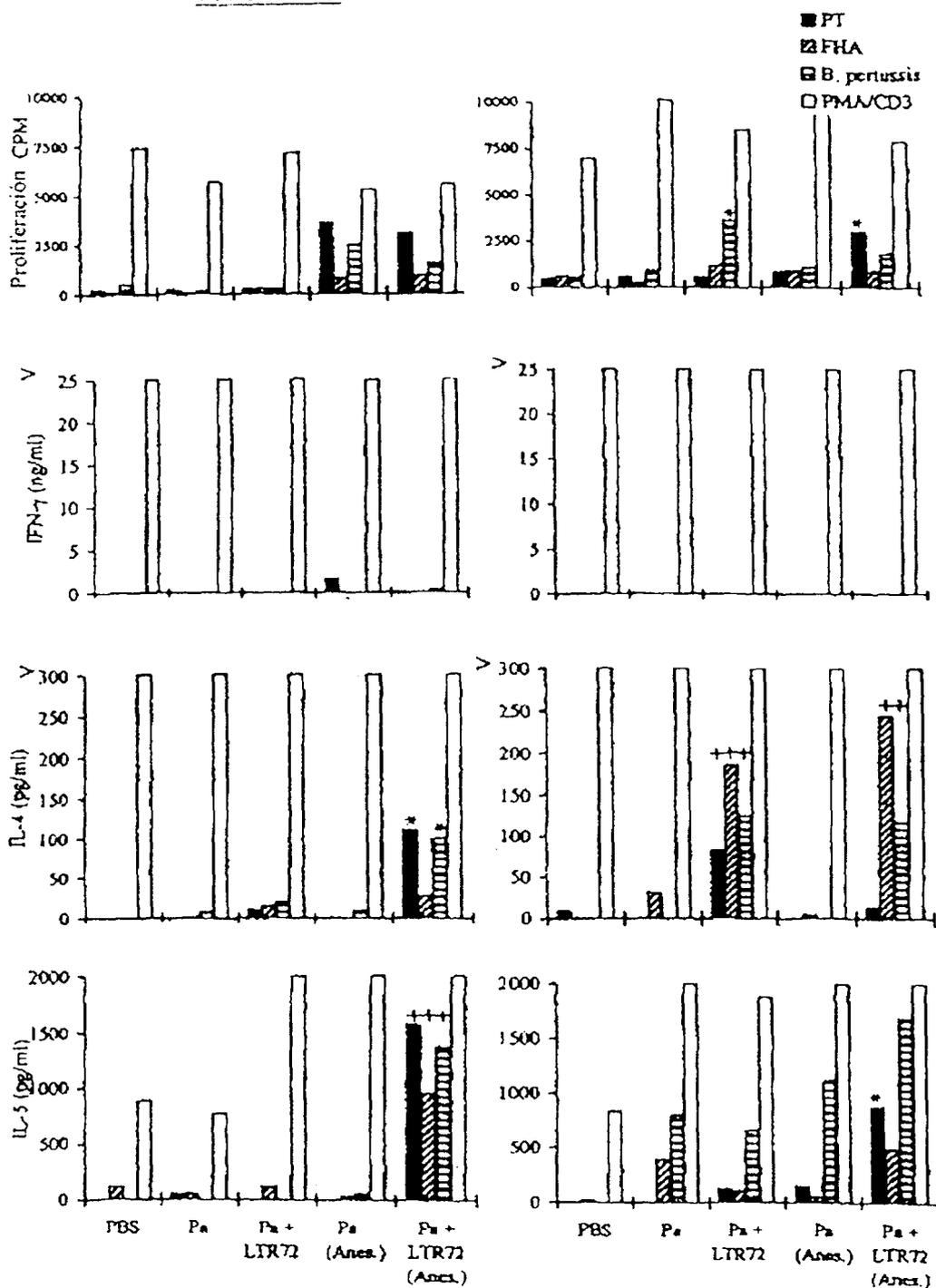


FIGURA 3A

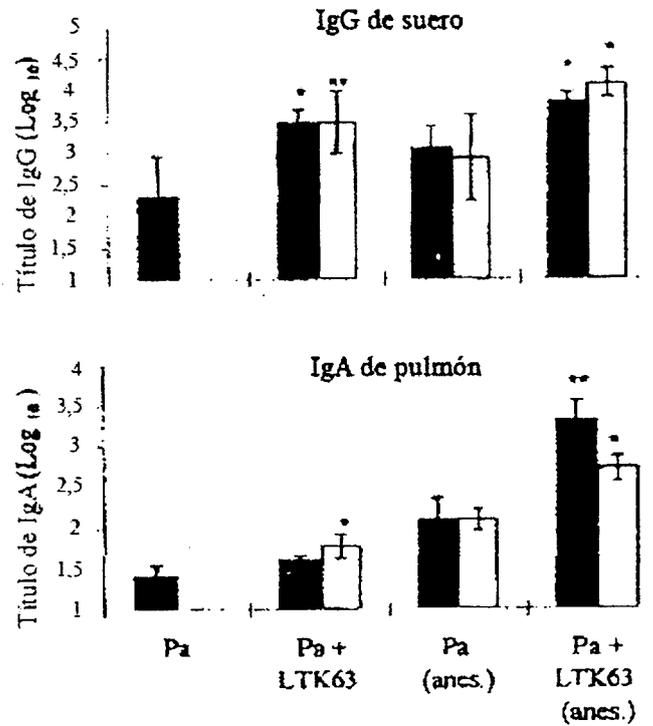


FIGURA 3B

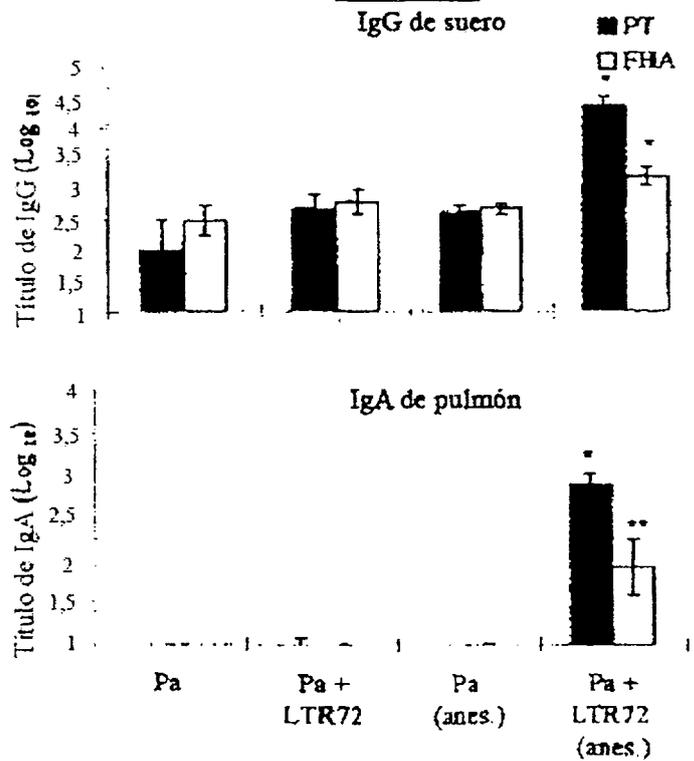


FIGURA 4

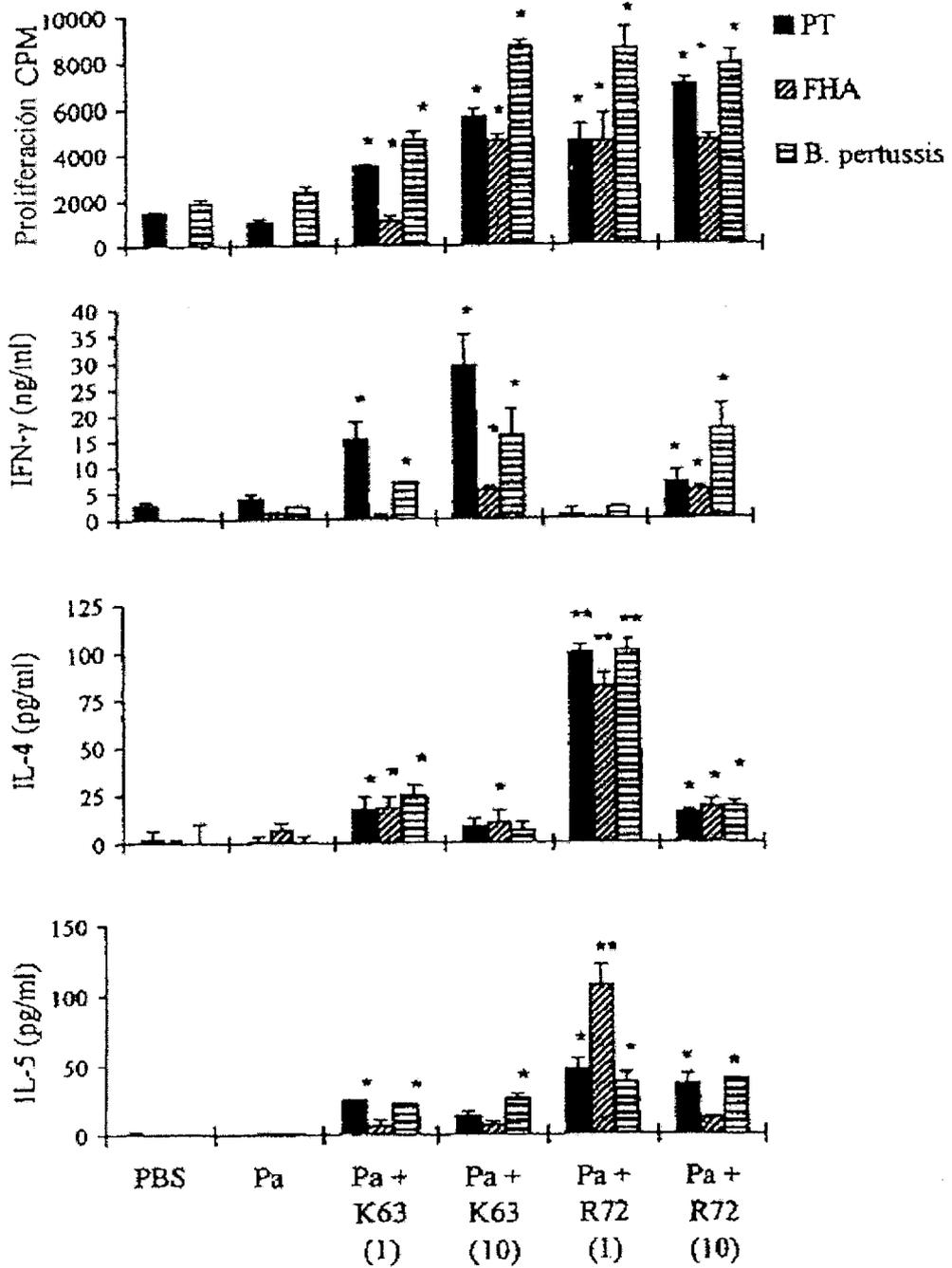


FIGURA 5A

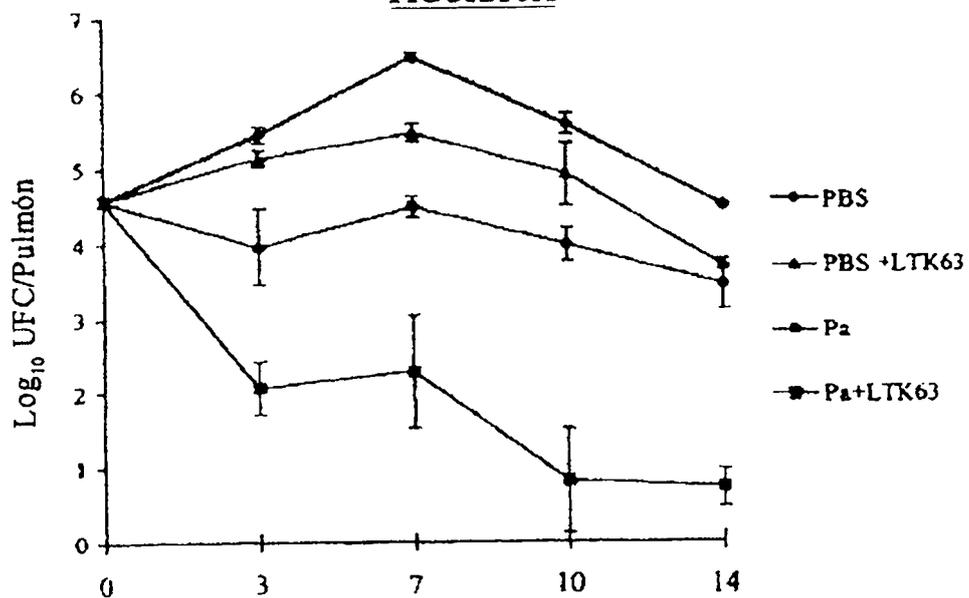


FIGURA 5B

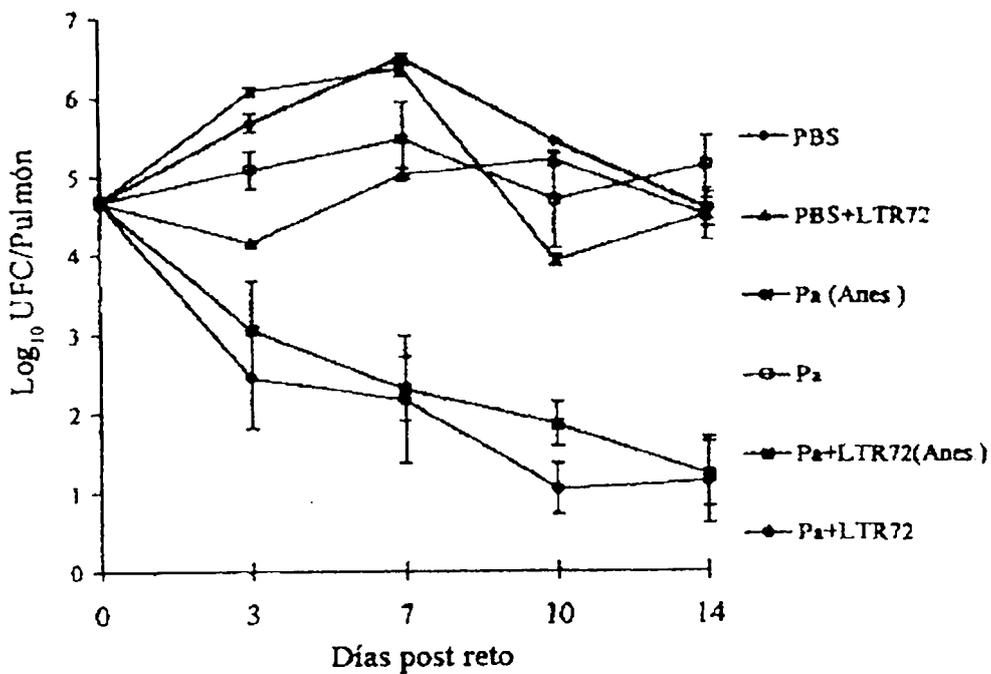


FIGURA 6

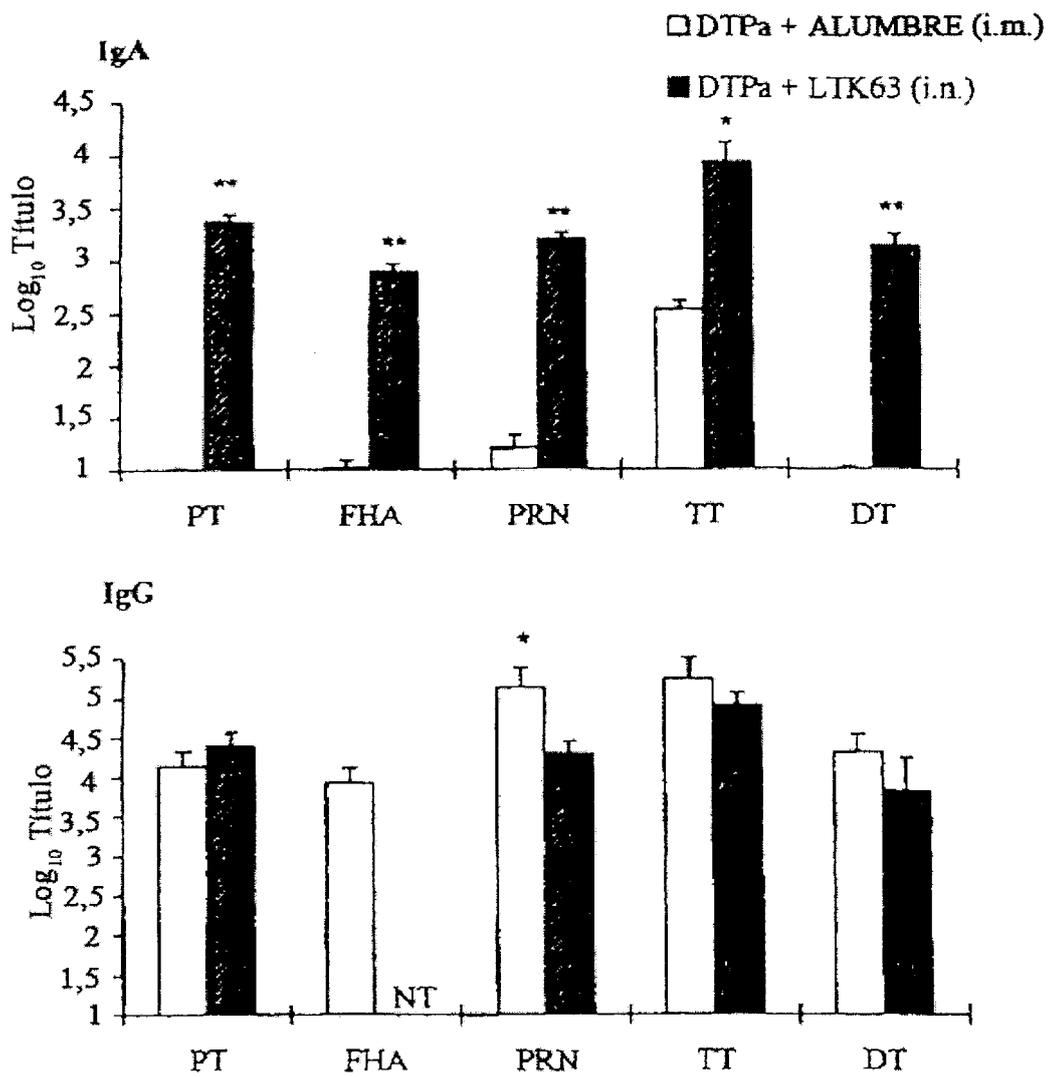


FIGURA 7

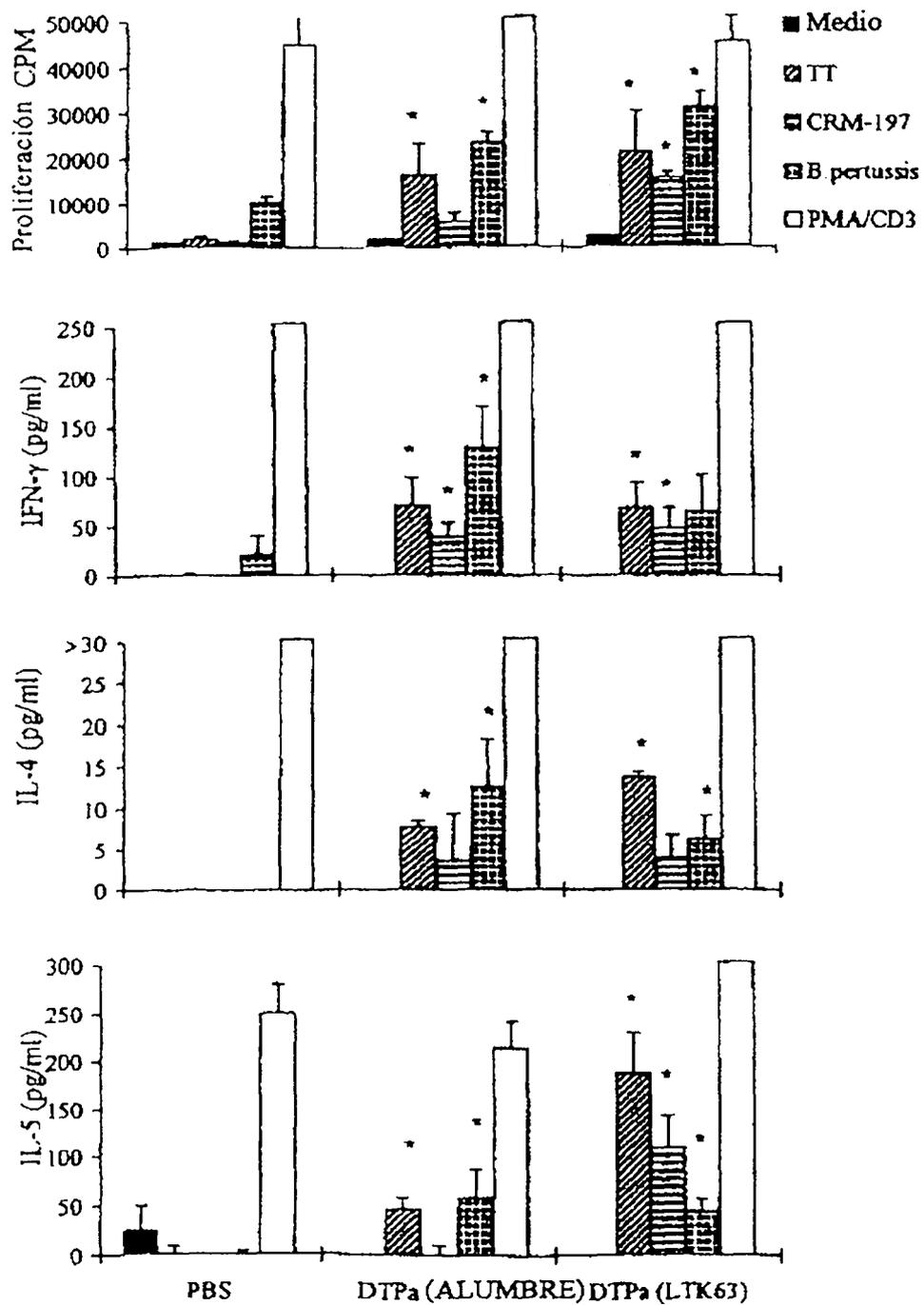


FIGURA 8

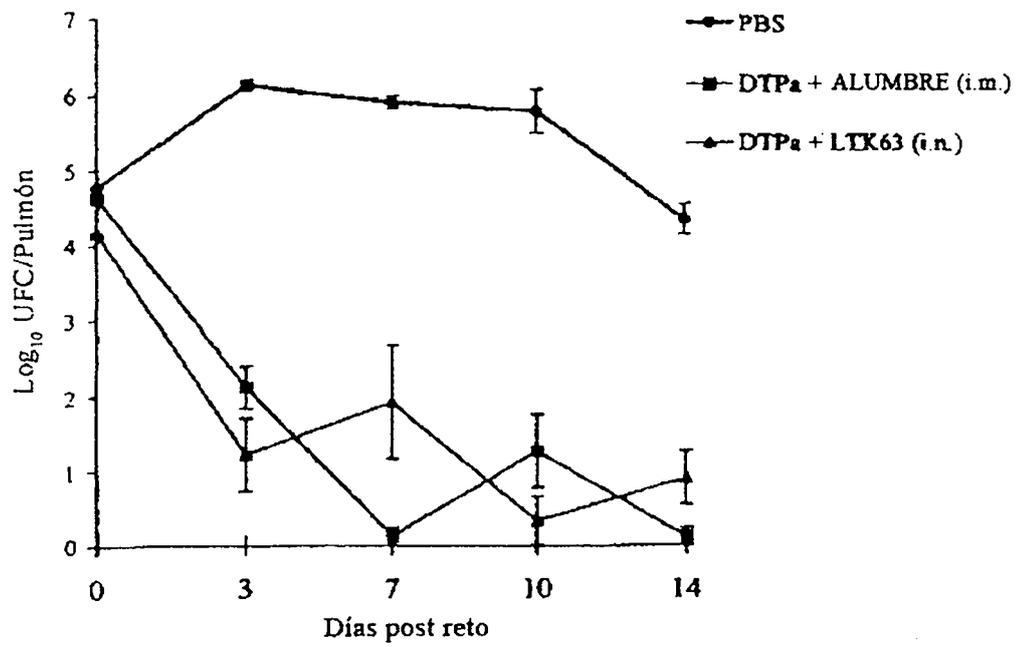


FIGURA 9

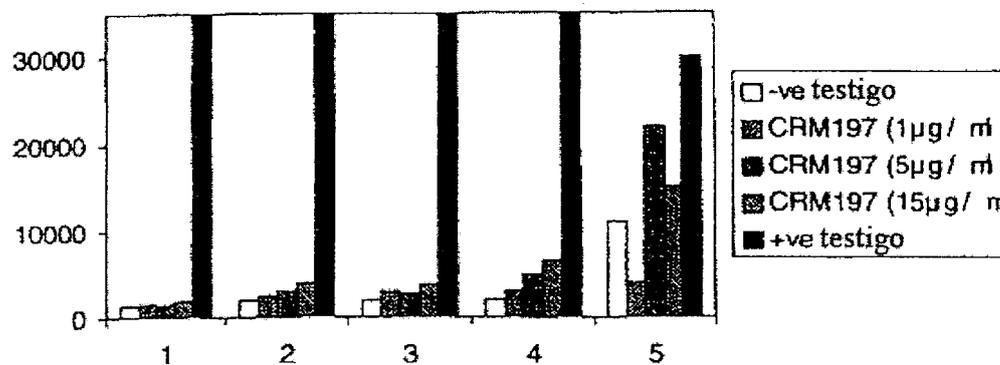
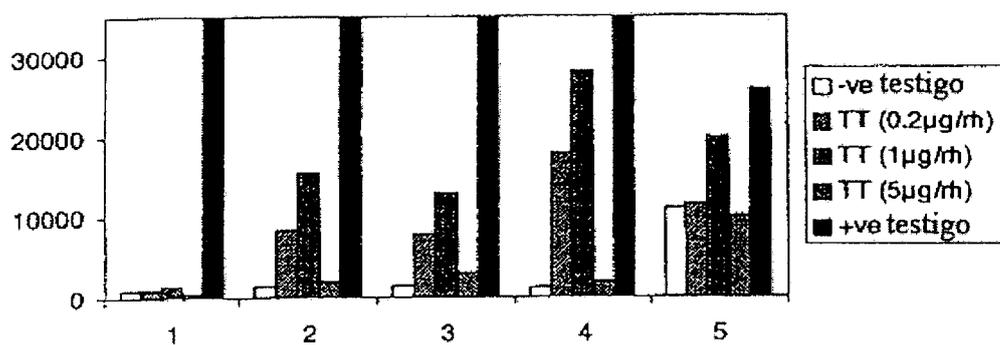
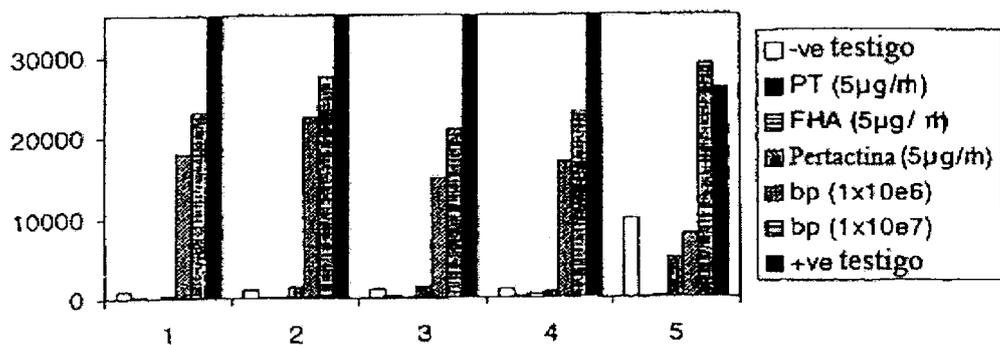


FIGURA 10

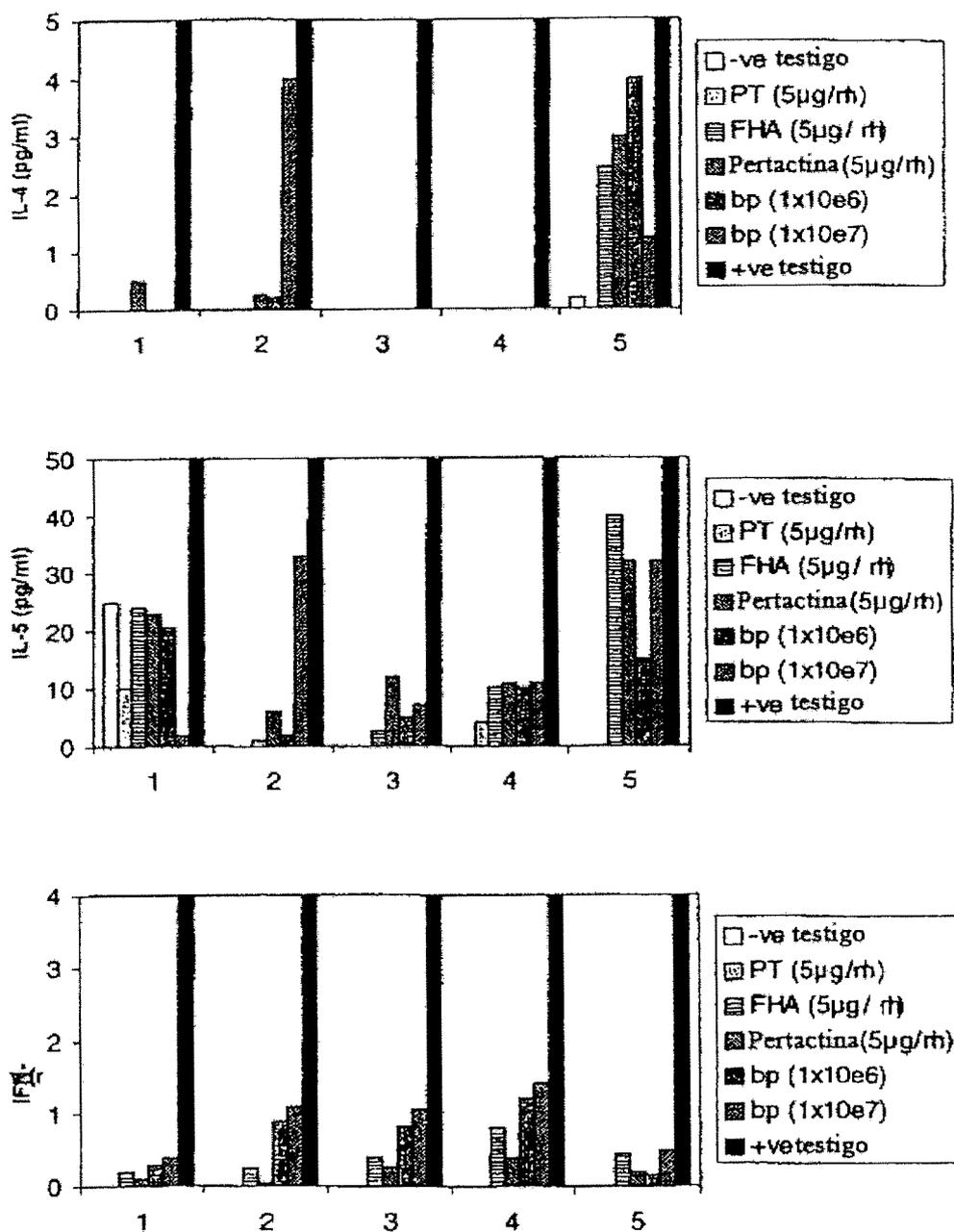


FIGURA 11

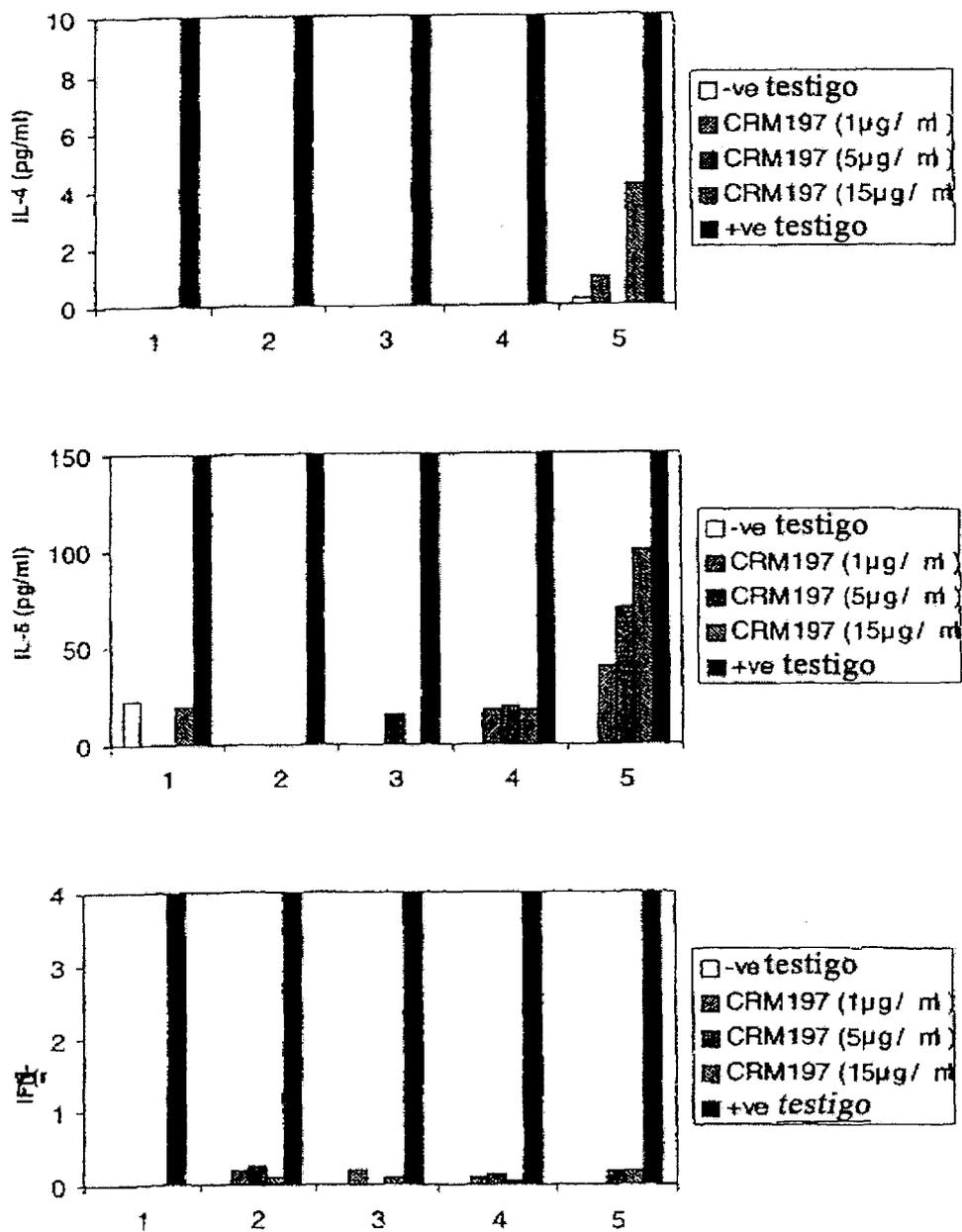


FIGURA 12

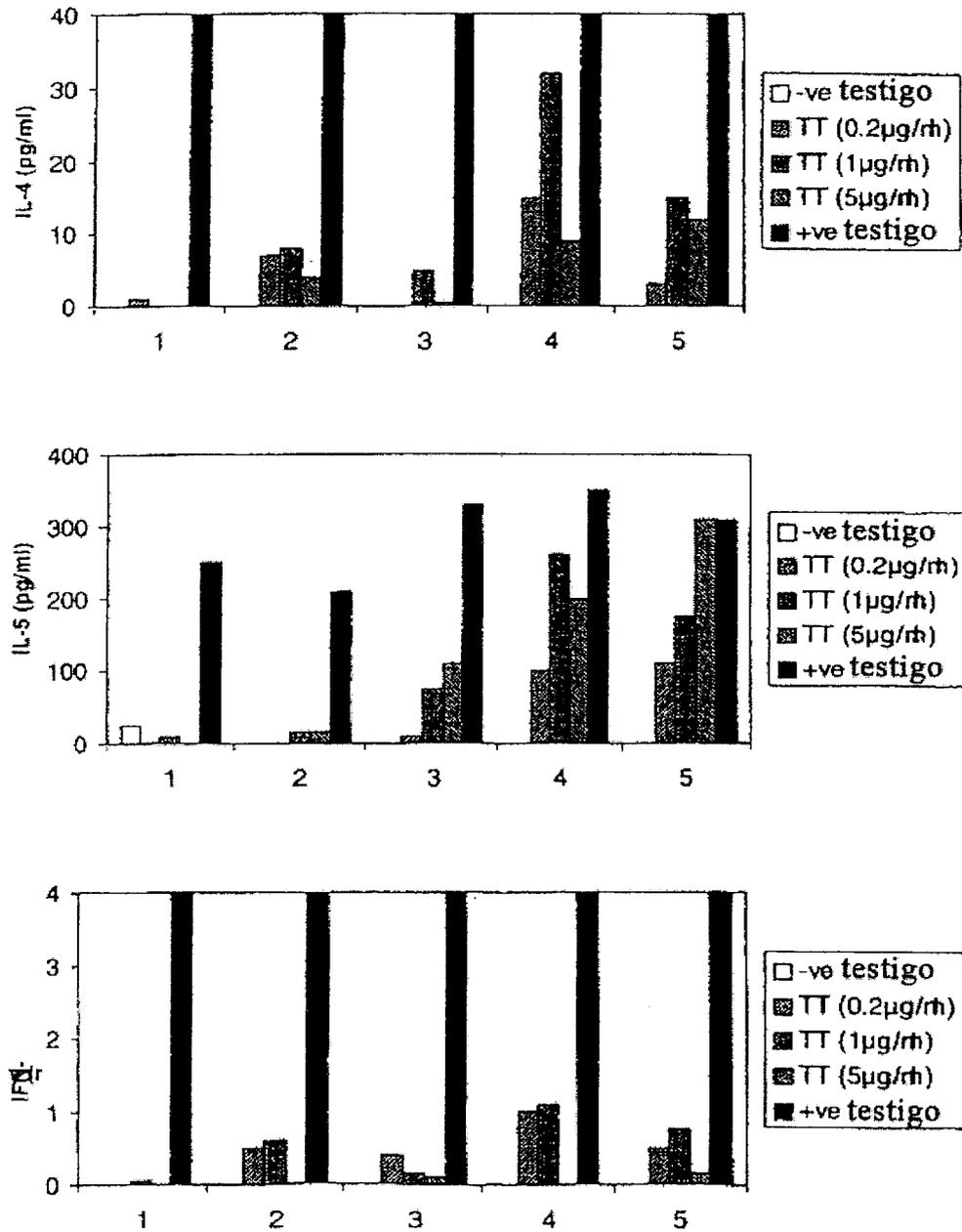


FIGURA 13

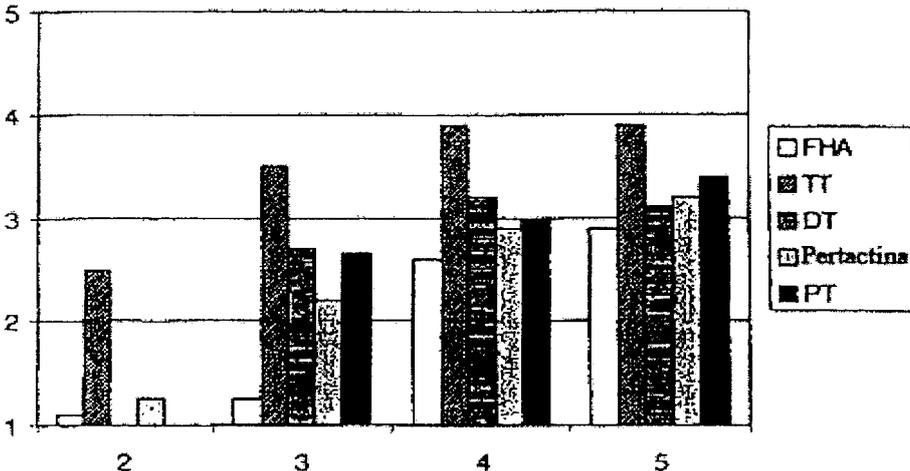
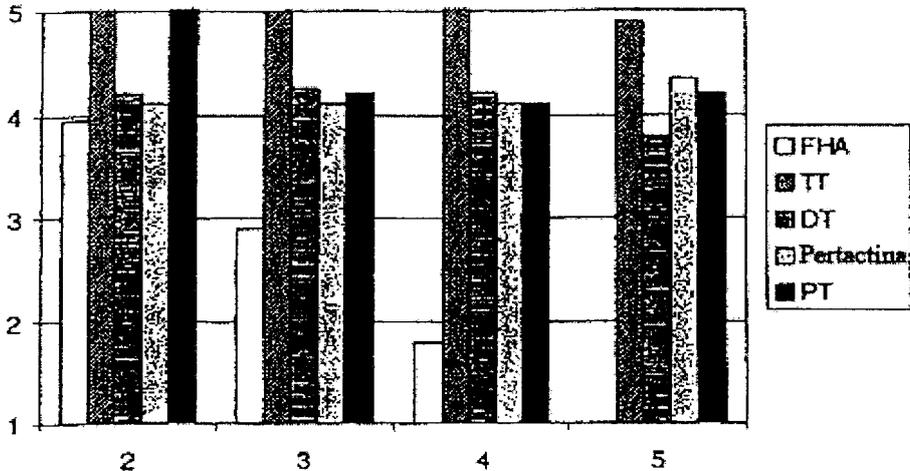


FIGURA 14

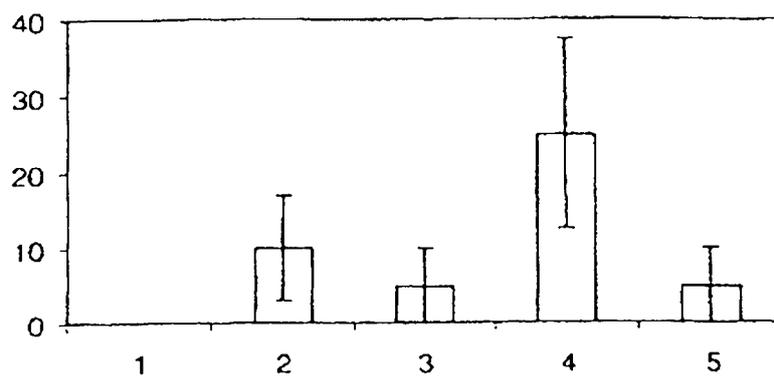


FIGURA 15

