(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 368 902**

(51) Int. CI.:
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01984626 .0**
(96) Fecha de presentación: **12.09.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1317279**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

(54) Título: **VACUNA CONTRA STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.**

(30) Prioridad:
15.09.2000 GB 0022742

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

(73) Titular/es:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE

(72) Inventor/es:
LAFERRIERE, Craig Antony Joseph y
POOLMAN, Jan

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

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra *Streptococcus pneumoniae*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas con antígenos polisacáridos bacterianos, su fabricación y el uso de estos polisacáridos en medicamentos.

En particular, la presente invención se refiere a vacunas que comprenden un antígeno polisacárido de neumococo, por lo general un antígeno conjugado polisacárido de neumococo, formulado con un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* y opcionalmente un adyuvante que induce Th1.

Antecedentes de la invención

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram-positiva responsable de morbilidad y mortalidad considerables (especialmente en los jóvenes y los ancianos), que causa enfermedades invasivas como neumonía, bacteremia y meningitis, y enfermedades asociadas con colonización, como otitis media aguda. La tasa de neumonía neumocócica en los EE.UU. para personas mayores de 60 años de edad se estima en 3 a 8 por 100.000. En el 20% de los casos esto lleva a bacteriemia y otras manifestaciones como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana al 30% incluso con tratamiento antibiótico.

El neumococo está encapsulado con un polisacárido unido químicamente que confiere especificidad de serotipo. Hay 90 serotipos conocidos de neumococo, y la cápsula es el determinante de virulencia principal del neumococo, ya que la cápsula no sólo protege la superficie interna de la bacteria del complemento, sino que es muy poco inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos T-independientes, y no pueden ser procesados o presentados en moléculas de MHC para interactuar con células T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmune a través de un mecanismo alternativo que comprende el entrecruzamiento de receptores de superficie en células B.

Se ha demostrado en varios experimentos que la protección contra la enfermedad invasiva por neumococo se correlaciona más fuertemente con un anticuerpo específico para la cápsula, y la protección es específica de serotipos.

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

Las últimas tres vacunas confieren protección contra bacterias que causan infecciones respiratorias que resultan en morbilidad y mortalidad graves en bebés, sin embargo estas vacunas no han sido autorizadas para su uso en niños menores de dos años de edad, ya que no son adecuadamente inmunogénicas en este grupo de edad [Peltola et al. (1984), N. Engl. J. Med. 310:1561-1566]. *Streptococcus pneumoniae* es la causa más común de enfermedad bacteriana invasiva y otitis media en bebés y niños pequeños. Del mismo modo, los ancianos desarrollan respuestas deficientes a las vacunas neumocócicas [Roghmann et al., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], de ahí el aumento en la incidencia de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk (1983), Medicine (Baltimore) 62:271-285].

Los abordajes que han sido diseñados para superar esta falta de inmunogenicidad en niños incluyen la unión de los polisacáridos a proteínas inmunogénicas grandes que proporcionan ayuda a las células T de activación inespecífica y que inducen memoria inmunológica contra el antígeno polisacárido al que se conjugan. Las vacunas conjugadas de glicoproteína neumocócica están siendo evaluadas actualmente en cuanto a seguridad, inmunogenicidad y eficacia en distintos grupos de edades.

La vacuna neumocócica 23-valente no conjugada ha mostrado una amplia variación en la eficacia clínica, de 0% a 81% (Fedson et al (1994) Arch Intern Med 154: 2531-2535). La eficacia parece estar relacionada con el grupo de riesgo que se está inmunizado, como los ancianos, con enfermedad de Hodgkin, esplenectomía, enfermedad de células falciformes y agammaglobulinémicos (Fine et al. (1994) Arch Intern Med. 154:2666-2677), y también con la manifestación de la enfermedad. La vacuna 23-valente no demuestra protección contra la neumonía neumocócica (en ciertos grupos de alto riesgo como los ancianos) y enfermedades de otitis media.

Por lo tanto, hay una necesidad de mejorar las composiciones de vacuna neumocócica, en particular las que serán más efectivas en la prevención o mejoría de la enfermedad neumocócica (particularmente neumonía) en ancianos y en niños pequeños.

La presente invención proporciona tal vacuna mejorada.

Sumario de la invención

En consecuencia la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* (preferentemente conjugado con una proteína transportadora) y un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste de la familia de la Tríada de Poli-Histidina (Pht; por ejemplo PhtA, PhtB, PhtD o PhtE), o equivalentes truncados o inmunológicamente funcionales de la misma, opcionalmente con un adyuvante Th1 (un adyuvante que induce una respuesta inmune Th1 predominantemente). Preferentemente se incluyen una proteína neumocócica y un adyuvante Th1. Se describen también composiciones ventajosas que comprenden combinaciones de las proteínas de neumococo de la invención anteriores entre sí y con otras proteínas de neumococo. Las composiciones de la invención son especialmente adecuadas en el tratamiento de la neumonía en ancianos.

Las vacunas de polisacáridos neumocócicos (conjugados o no) pueden no ser capaces de proteger contra la neumonía en la población anciana para la cual la incidencia de esta enfermedad es muy alta. El mecanismo de defensa clave contra el neumococo es la opsonofagocitosis (un evento humoral mediado por células B/neutrófilos causado por la producción de anticuerpos contra el polisacárido neumocócico, la bacteria finalmente es fagocitada), sin embargo parte de los mecanismos de opsonización involucrados están deteriorados en los ancianos, es decir, producción de superóxido por PMN (células polimorfonucleares), producción de otras especies reactivas del oxígeno, movilización de PMN, apoptosis de PMN, deformabilidad de PMN. Las respuestas de anticuerpos también pueden verse afectadas en los ancianos.

Contrariamente al dogma aceptado normalmente, los niveles normales de anticuerpos anti-polisacárido capsular pueden no ser efectivos en la eliminación completa de las bacterias, ya que los neumococos pueden invadir las células huésped para evadir esta rama del sistema inmune.

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

Sin ánimo de quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores han encontrado que ambas ramas del sistema inmune pueden sinergizarse de esta manera si un polisacárido neumocócico (preferentemente conjugado a una proteína transportadora) se administra con una proteína neumocócica seleccionada del grupo que consiste de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, (proteínas que pueden ser procesadas y presentadas en el contexto de MHC de Clase II y Clase I en la superficie de células de mamífero infectadas). Aunque una o varias de estas proteínas de neumococo pueden desencadenar la inmunidad mediada por células por sí mismas, los inventores también han encontrado que la presencia de un adyuvante que induce Th1 en la formulación de la vacuna ayuda a esta rama del sistema inmune, y sorprendentemente mejora aún más la sinergia entre ambas ramas del sistema inmune.

Descripción de la invención

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

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

Así, en una realización de la invención se proporciona una composición de vacuna, adecuada para su uso en los ancianos (y/o bebés y niños pequeños) que comprende al menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y al menos un antígeno(s) proteico(s) de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE. La vacuna puede comprender opcionalmente un adyuvante Th1.

En una segunda realización preferida, la presente invención proporciona una vacuna (adecuada para la prevención de la neumonía en los ancianos) que comprende al menos uno (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) antígeno(s) polisacárido(s) de *Streptococcus pneumoniae* y al menos un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, y, preferentemente, un adyuvante Th1.

En las realizaciones anteriores también están previstas vacunas que comprenden ventajosamente combinaciones de las proteínas de neumococo de la invención anteriores entre sí y con otras proteínas de neumococo como se describe a continuación.

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

Antígenos polisacáridos de Streptococcus pneumoniae de la invención

Típicamente la vacuna para *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá antígenos polisacáridos (preferentemente conjugados con una proteína transportadora), en la que los polisacáridos derivan de al menos cuatro serotipos de neumococo. Preferentemente, los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. Más preferentemente, por lo menos siete serotipos están incluidos en la composición, por ejemplo, los derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Aún más preferentemente, al menos 11 serotipos están incluidos en la composición, por ejemplo, la composición en una realización incluye polisacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (preferentemente conjugados a una proteína transportadora). En una realización preferida de la invención se incluyen al menos 13 antígenos polisacáridos (preferentemente conjugados con una proteína transportadora), aunque más antígenos polisacáridos, por ejemplo 23-valentes (como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F), también se contemplan en la invención.

Para la vacunación de ancianos (por ejemplo, para la prevención de neumonía) es ventajoso incluir los serotipos 8 y 12F (y más preferentemente 15 y 22 también) a la composición antigénica 11-valente descrita anteriormente para formar una vacuna 15-valente, mientras que para bebés o niños pequeños (en los que la otitis media es más preocupante) los serotipos 6A y 19A están incluidos ventajosamente para formar una vacuna 13-valente.

Si bien los polisacáridos anteriores pueden ser utilizado en su forma nativa de longitud completa, debe entenderse que también pueden utilizarse polisacáridos de tamaño reducido que aún son inmunogénicos (véase por ejemplo, EP 497524 y 497525).

Para la prevención/mejora de la neumonía en la población de ancianos (55 años) y en bebés (hasta 18 meses) y niños pequeños (típicamente de 18 meses a 5 años) con otitis media, una forma de realización preferida de la invención es combinar un polisacárido multivalente de *Streptococcus pneumoniae* como se describe en la presente memoria con una proteína de *Streptococcus pneumoniae* seleccionada del grupo consistente de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, o un equivalente inmunológicamente funcional de los mismos. Una combinación de proteínas de neumococo también puede ser utilizada ventajosamente como se describe a continuación.

Proteínas de neumococo de la invención

A los fines de esta invención, “equivalente inmunológicamente funcional” se define como un péptido de proteína que comprende al menos un epitopo protector de las proteínas de la invención. Estos epitopos están característicamente expuestos en la superficie, son altamente conservados, y pueden provocar una respuesta de anticuerpos bactericidas en un huésped o prevenir efectos tóxicos. Preferentemente, el equivalente funcional tiene por lo menos 15 y preferentemente 30 o más aminoácidos contiguos de la proteína de la invención. Más preferentemente, pueden utilizarse fragmentos, eliminaciones de la proteína, como variantes de eliminación transmembrana de la misma (es decir, el uso del dominio extracelular de las proteínas), fusiones, derivados detoxificados química o genéticamente y similares con la salvedad de que sean capaces de desarrollar sustancialmente la misma respuesta inmune que la proteína nativa. La posición de los epitopos potenciales de las células B en una secuencia de proteínas pueden ser fácilmente determinada por la identificación de péptidos que están expuestos en la superficie y son antigénicos utilizando una combinación de dos procedimientos: predicción de estructura bidimensional y predicción de índice antigénico. La predicción de la estructura bidimensional puede hacerse usando el programa PSIPRED (de David Jones, Grupo de Bioinformática de Brunel, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Brunel, Uxbridge UB8 3PH, Reino Unido). El índice antigénico puede calcularse sobre la base del procedimiento descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

Las proteínas de la invención son las proteínas siguientes, todas las cuales están expuestas en la superficie externa del neumococo (capaces de ser reconocidas por el sistema inmune del huésped durante al menos parte del ciclo de vida del neumococo), o son proteínas que son secretadas o liberadas por el neumococo.

La proteína de *Streptococcus pneumoniae* de la invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste de: una proteína de la familia de la tríada de polihistidina (Pht), una proteína de la familia Lyt, una proteína de unión a colina, proteínas que tienen un motivo LPXTG (en el que X es cualquier aminoácido), proteínas que tienen un motivo de secuencia de Señal de Tipo II de LXXC (en la que X es cualquier aminoácido), y proteínas que tienen un motivo de secuencia de Señal de Tipo I. Los ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las proteínas siguientes (o equivalentes truncados o inmunológicamente funcionales de las mismas):

La familia HTP (Tríada de Poli Histidina) comprende proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente involucradas en la unión a metales o nucleósidos o actividad enzimática, regiones (3-5) enrolladas en espiral, un N-terminal conservado y un C-terminal heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos examinados. Se han encontrado también proteínas homólogas en otros estreptococos y *Neisseria*. Los miembros preferidos de la familia comprenden PhtA, PhtB y PhtD. Más preferentemente, comprenden PhtA o PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D y E se refieren a proteínas que tienen las secuencias desveladas en las citas a continuación así como a variantes de origen natural (y artificial) que tienen una homología

de secuencia que es al menos 90% idéntica a las proteínas mencionadas. Preferentemente, es al menos 95% idéntica y muy preferentemente 97% idéntica.

En cuanto a las proteínas Pht, PhtA se desvela en el documento WO 98/18930, y también se menciona como Sp36. Como se señaló anteriormente, es una proteína de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II de LXXC.

PhtD se desvela en el documento WO 00/37105, y también se menciona como Sp036D. Como se señaló anteriormente, es también una proteína de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II de LXXC.

PhtB se desvela en el documento WO 00/37105, y también se menciona como Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el Polipéptido de Degradación C3, según se desvela en el documento WO 00/17370. Esta proteína también pertenece a la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II de LXXC. Un equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína SP42 desvelada en el documento WO 98/18930. Un truncado de PhtB (aproximadamente 79kD) se desvela en el documento WO99115675 que también se considera un miembro de la familia PhtX.

PhtE se desvela en el documento WO00/30299 y se menciona como BVH-3.

Las proteínas usadas en la presente invención se seleccionan preferentemente del grupo PhtD y PhtA, o una combinación de ambas de estas proteínas.

Combinación ventajosa de una o más proteínas de neumococo de la invención con otras proteínas de neumococo

En la vacuna de la invención, cada una de las proteínas anteriores de la invención (preferentemente una o ambas de PhtD y PhtA) también pueden combinarse beneficiosamente con una o más proteínas de neumococo de la siguiente lista: neumolisina (también conocida como Ply; preferentemente detoxificada por tratamiento químico o mutación) [WO 96/05859, WO 90/06951, WO 99/03884], PsaA y variantes de eliminación transmembrana de la misma (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64 (12):5255-62), PspA y variantes de eliminación transmembrana de la misma (US 5804193, WO 92/14488, WO 99/53940), PspC y variantes de deleción transmembrana de la misma (WO 97/09994, WO 99/53940), un miembro de de la familia de Proteína de unión a colina (Cbp) [por ejemplo, CbpA y variantes de deleción transmembrana de la misma (WO 97/41151, WO 99/51266)], Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64:3544), HSP70 (WO 96/40928), PcpA (Sanchez-Beato *et al.* FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14), proteína símil M (solicitud de patente SB Núm. EP 0837130), y adhesión 18627 (solicitud de patente SB Núm. EP 0834568). La presente invención también comprende equivalentes inmunológicamente funcionales o truncados de dichas proteínas (como se definió anteriormente).

En cuanto a la familia de Proteína de Unión a Colina, los miembros de esa familia fueron identificados originalmente como proteínas de neumococo que podían ser purificadas por cromatografía de afinidad con colina. Todas las proteínas de unión a colina están unidas no covalentemente a restos de fosforilcolina de ácido teicoico de la pared celular y ácido lipoteicoico asociado a membranas. Estructuralmente, hay varias regiones en común en toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión a colina comprenden una región N terminal (N), regiones de repetición (R1 y/o R2) conservadas, una región rica en prolina (P) y una región de unión de colina (C) conservada, compuesta por múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se usa en esta solicitud, el término “familia de Proteínas de Unión a Colina (Cbp)” se selecciona del grupo que consiste de Proteínas de Unión a Colina como se identifica en el documento WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD y CbpG. CbpA se desvela en WO 97/41151. CbpD y CbpG se desvelan en WO 00/29434. PspC se desvela en WO 97/09994. PbcA se desvela en WO 98/21337. Preferentemente las Proteínas de Unión a Colina se seleccionan del grupo que consiste de CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Si un Cbp es la proteína adicional utilizada, puede ser un truncado de Cbp en el que “Cbp” es el definido anteriormente y “truncado” se refiere a proteínas que carecen de 50% o más de la región de unión a Colina (C). Preferentemente estas proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Más preferentemente, estos truncados de proteína carecen de (i) la región de unión a colina y (ii) una parte de la mitad N-terminal de la proteína también, aunque retienen al menos una región de repetición (R1 o R2). Aún más preferentemente, el truncado tiene dos regiones de repetición (R1 y R2). Ejemplos de tales realizaciones preferidas son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, otras proteínas de unión a colina que carecen de una región de unión a colina similar también se contemplan dentro del alcance de esta invención.

Pueden usarse también proteínas quiméricas (o fusiones) de truncado de Cbp-truncado de Lyt en la vacuna de la invención. Preferentemente, esto comprende NR1xR2 (o R1xR2) de Cbp y la porción C-terminal (Cterm, es decir, que carecen de los dominios de unión a colina) de Lyt (por ejemplo, LytCCterm o Sp9lCterm). Más preferentemente Cbp se selecciona del grupo que consiste de CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Aún más preferentemente, es CbpA. Preferentemente, Lyt es LytC (también conocido como Sp91).

Puede utilizarse también un truncado de PspA o PsaA que carece del dominio de unión a colina (C) y se expresa como una proteína de fusión con Lyt. Preferentemente, Lyt es LytC.

Combinaciones preferidas de proteínas de neumococo para los propósitos de esta invención

Preferentemente, la combinación de proteínas de la invención se selecciona a partir de 2 o más (3 o 4) categorías diferentes como proteínas que tienen un motivo de secuencia de señal de tipo II de LXXC (en la que X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia de la tríada de polihistidina (Pht)), proteínas de unión a colina (Cbp), proteínas que tienen un motivo de secuencia de señal de Tipo I (por ejemplo, SP101), proteínas que tienen un motivo LPXTG (en la que X es cualquier aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130), toxinas (por ejemplo, Ply), etc. Los ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las proteínas mencionadas anteriormente, o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas. Toxina + Pht, toxina + Cbp, Pht + Cbp, y toxina + Pht + Cbp son combinaciones de categorías preferidas.

Las combinaciones beneficiosas preferidas incluyen, entre otras, a PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm proteínas quiméricas o de fusión, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm proteínas quiméricas o de fusión, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferentemente, NR1xR2 (o R1xR2) proviene de CbpA or PspC.

Una combinación particularmente preferida de proteínas de neumococo comprende Ply (o un truncado o equivalente inmunológicamente funcional del mismo) + PhtD (o un truncado o equivalente inmunológicamente funcional del mismo) + NR1xR2 (o R1xR2). Preferentemente, NR1xR2 (o R1xR2) proviene de CbpA o PspC. Más preferentemente proviene de CbpA.

Sin ánimo de quedar ligados a teoría alguna, dentro de la composición la proteína neumocócica (o combinaciones descritas anteriormente) de la invención puede ayudar a inducir una respuesta mediada por células T contra la enfermedad neumocócica - particularmente requerida para la protección contra la neumonía - que coopera con la rama humoral del sistema inmune para inhibir la invasión por neumococos y estimular la opsonofagocitosis. Una ventaja adicional de incluir el antígeno de la proteína es la presentación de antígenos adicionales para el procedimiento de opsonofagocitosis.

Por consiguiente, en una realización de la invención se proporciona una vacuna para *Streptococcus pneumoniae* que comprende una vacuna conjugada de polisacárido de neumococo que comprende antígenos polisacáridos derivados de al menos cuatro serotipos, preferentemente al menos siete serotipos, con mayor preferencia al menos once serotipos, y por lo menos, pero preferentemente 2, 3, o 4 proteínas de *Streptococcus pneumoniae* seleccionadas del grupo que consistente de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, (o una combinación de proteínas de neumococo como las descritas anteriormente). Preferentemente una de las proteínas es PhtA (o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma). Más preferentemente una de las proteínas es PhtD (o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma).

Como se mencionó anteriormente, un problema asociado con el enfoque de polisacáridos en la vacunación es el hecho de que los polisacáridos de por sí son poco inmunogénicos. Para superar esto, los polisacáridos pueden conjugarse con transportadores proteicos que proporcionan ayuda a células T de activación inespecífica. Es preferente, por lo tanto, que los polisacáridos utilizados en la invención estén unidos a un transportador proteico. Los ejemplos de estos transportadores que se utilizan comúnmente en la actualidad para la producción de inmunógenos polisacáridos incluyen los toxoides diftérico y tetánico (DT, DT CRM197 y TT, respectivamente), Hemocianina de Lapa Californiana (KLH), OMPC de *N. meningitidis* y el derivado proteico purificado de Tuberculina (PPD).

Un transportador preferido para composiciones inmunogénicas (o vacunas) basadas en polisacáridos neumocócicos es la proteína D de *Haemophilus influenzae* (EP 594.610-B), o fragmentos de la misma. Los fragmentos adecuados para el uso incluyen fragmentos que comprenden epitopos de células T auxiliares. En particular, un fragmento de proteína D contendrá preferentemente el N-terminal 1/3 de la proteína. Un transportador de proteína D es sorprendentemente útil como transportador en vacunas en las que se conjugan múltiples antígenos polisacáridos de neumococo. Generalmente es probable que ocurra la supresión de epitopos si se utiliza el mismo transportador para cada polisacárido. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que la proteína D es especialmente adecuada para minimizar estos efectos de supresión epitópica en vacunas combinadas. Uno o más polisacáridos de neumococo en una combinación pueden ser conjugados ventajosamente a la proteína D, y preferentemente todos los antígenos son conjugados a la proteína D en esta vacuna combinada.

Un transportador de mayor preferencia para el polisacárido neumocócico es la proteína de neumococo en sí misma (como se definió anteriormente en la sección “Proteínas de neumococo de la invención”).

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

Preferentemente, la relación proteína:polisacárido (peso:peso) de los conjugados es 0,3:1 a 1:1, más preferentemente 0,6:1 a 0,8:1, y con la mayor preferencia de aproximadamente 0,7:1.

Las vacunas de la presente invención son preferentemente con adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también pueden ser una sal de calcio, magnesio, hierro o zinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados en forma catiónica o aniónica, o polifosfacenos.

Es preferente que el adyuvante sea seleccionado para ser un inductor preferencial de un tipo TH1 de respuesta a fin de ayudar a la rama mediada por células de la respuesta inmune.

Adyuvantes TH1 de la invención

Los niveles altos de citoquinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno determinado, mientras que niveles altos de citoquinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

Es importante recordar que la distinción de la respuesta inmune de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo apoyará una respuesta inmune que se describe como predominantemente Th1 o predominante Th2. Sin embargo, suele ser conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de lo descrito en clones de células T positivas para CD4 murinas por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se asocian con la producción de INF-γ y citoquinas IL-2 por linfocitos T. Otras citoquinas que suelen asociarse directamente con la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 no son producidas por células T, como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Los sistemas de adyuvantes adecuados que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen: Monofosforil lípido A o un derivado del mismo, particularmente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación véase GB 2220211 A), y una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con una sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En estas combinaciones, el antígeno y 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras de partículas, lo que permite una administración más eficiente de señales antigénicas e inmunoestimulantes. Los estudios han demostrado que 3D-MPL es capaz de mejorar aún más la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en alumbre [Thoelen *et al.* Vaccine (1998), 16:708-14, EP 689454-B1].

Un sistema mejorado comprende la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se desactiva con colesterol como se desvela en WO 96/33739.

Una formulación adyuvante particularmente potente que comprende QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua se describe en WO 95/17210, y es una formulación preferida.

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

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

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

Las composiciones particularmente preferidas de la invención comprenden uno o más polisacáridos neumocócicos conjugados, una o más proteínas de neumococo de la invención y un adyuvante Th1. Sin ánimo de estar limitados por ninguna teoría, la inducción de una respuesta mediada por células a través de una proteína neumocócica (como se describió anteriormente) y la cooperación entre las dos ramas del sistema inmune pueden ser ayudadas utilizando un adyuvante Th-1, lo que resulta en una vacuna particularmente efectiva contra la enfermedad neumocócica en general, y, particularmente, contra la neumonía neumocócica en los ancianos.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un inmunógeno o vacuna como se describe en la presente memoria para su uso en medicina.

En una realización hay un procedimiento para prevenir o mejorar la neumonía en un ser humano anciano (+55 años), que comprende administrar una cantidad segura y efectiva de una vacuna, como se describe en la presente memoria, que comprende un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y una proteína neumocócica seleccionada del grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, y opcionalmente un adyuvante Th1, a dicho paciente anciano.

En otra realización se proporciona un procedimiento para prevenir o mejorar la otitis media en bebés (hasta 18 meses) o niños pequeños (típicamente de 18 meses a 5 años), que comprende administrar una cantidad segura y efectiva de una vacuna que comprende un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, y opcionalmente un adyuvante Th1, a dichos bebés o niños pequeños.

Preferentemente en los procedimientos de la invención descritos anteriormente el antígeno polisacárido está presente como un conjugado de proteína de polisacárido.

Preparaciones de vacunas de la invención

Las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden utilizarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible a infección, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (ya que el transporte nasofaríngeo del neumococo puede prevenirse con mayor efectividad, atenuando así la infección en su etapa más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede ser administrada en una dosis única, sus componentes también pueden ser co-administrados juntos en el mismo momento o en momentos distintos (por ejemplo, los polisacáridos de neumococo pueden administrarse por separado en el mismo momento o 1-2 semanas después de la administración del componente proteína bacteriana de la vacuna para la coordinación óptima de las respuestas inmunes una con respecto a la otra). Para la coadministración, el adyuvante Th1 opcional puede estar presente en cualquiera o todas las diferentes administraciones, sin embargo es preferente que esté presente en combinación con el componente proteína bacteriana de la vacuna. Además de una sola vía de administración, pueden utilizarse dos vías de administración diferentes. Por ejemplo, cualquier antígeno viral puede ser administrados por vía ID (intradérmica), mientras que las proteínas bacterianas pueden administrarse por vía IM (intramuscular) o IN (intranasal). Los polisacáridos pueden administrarse por vía IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse por vía IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse por vía IM para las dosis iniciales y por vía IN para dosis de refuerzo.

La cantidad de antígeno conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que se utiliza y cómo se presenta. Generalmente, se espera que cada dosis comprenderá 0,1-100 µg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 µg, preferentemente 0,1-10 µg, de los cuales 1 a 5 µg es el intervalo más preferente.

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

Las cantidades óptimas de los componentes de una vacuna en particular pueden determinarse mediante estudios estándar que implican la observación de la respuesta inmune adecuada en sujetos. Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

La preparación de la vacuna se describe en forma general en Vaccine Design (“The subunit and adjuvant approach” (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación en liposomas es descrita por Fullerton, Patente Estadounidense 4.235.877.

Aunque las vacunas de la presente invención pueden ser administradas por cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula exterior “callosa”, llamada estrato córneo, que se superpone a la epidermis. Por debajo de esta epidermis está una capa llamada la dermis, que a su vez se superpone a la del tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular en la dermis, estimula una respuesta inmune, lo que también puede estar asociado con una serie de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en este documento constituye una característica preferida de la presente invención.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el “procedimiento de mantoux”, comprende las etapas de limpiar la piel, y a continuación estirarla con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) mirando hacia arriba se inserta la aguja en un ángulo de entre 10-15º. Una vez insertado el bisel de la aguja, el cilindro de la aguja se baja y hace avanzar mientras se proporciona una ligera presión para elevarlo debajo de la piel. El líquido se inyecta entonces muy lentamente formando una ampolla o protuberancia en la superficie de la piel, seguido de la retirada lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que están diseñados específicamente para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo, los dispositivos que se describen en WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección de chorro descritos por ejemplo en WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520, 639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97137705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos de

administración intradérmica de preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para la administración balística de vacunas sólidas (WO 99/27961), o parches transdérmicos (WO 97/48440, WO 98/28037), o aplicados a la superficie de la piel (administración transdérmica o transcutánea WO 98/20734, WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención se han de administrar en la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen de líquido bajo, particularmente un volumen de entre 0,05 ml y 0,2 ml.

El contenido de antígenos en las vacunas cutáneas o intradérmicas de la presente invención puede ser similar a las dosis convencionales que se encuentran en las vacunas intramusculares (ver anterior). Sin embargo, es una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas que las formulaciones pueden ser de “dosis bajas”. Por lo tanto, las vacunas de antígenos proteicos en “dosis bajas” están presentes preferentemente en tan sólo 0,1 a 10 µg, preferentemente 0,1 a 5 µg por dosis; y los antígenos polisacáridos (preferentemente conjugados) pueden estar presentes en el intervalo de 0,1-1 µg, y preferentemente entre 0,01 a 0,5 µpg de polisacárido por dosis.

Como se usa en la presente memoria, el término “administración intradérmica” se refiere a la administración de la vacuna en la región de la dermis de la piel. Sin embargo, la vacuna no necesariamente está localizada exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa de la piel situada entre 1,0 y 2,0 mm de la superficie de la piel humana, pero hay un cierto grado de variación entre los individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis yendo 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis se encuentra situada entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea por debajo. Dependiendo del modo de administración, la vacuna puede estar en última instancia ubicada exclusiva o principalmente en la dermis, o en última instancia puede estar distribuida en la epidermis y la dermis.

La presente invención también contempla vacunas combinadas que brindan protección contra una gama de patógenos diferentes. Muchas vacunas pediátricas son administradas ahora como una vacuna combinada de modo de reducir el número de inyecciones que tiene que recibir un niño. Así, para las vacunas pediátricas otros antígenos de otros patógenos pueden ser formulados con las vacunas de la invención. Por ejemplo, las vacunas de la invención pueden ser formuladas con (o administradas por separado, pero al mismo momento) la bien conocida vacuna combinada “trivalente” que comprende toxoide diftérico (DT), toxoide tetánico (TT), y componentes de tos ferina [típicamente toxoide de pertussis (PT) detoxificado y hemaglutinina filamentosa (FHA) con pertactina (PRN) y/o aglutinina 1+2 opcionales], por ejemplo, la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biological) que contiene antígenos de DT, TT, PT, FHA y PRN, o con un componente celular de tos ferina entero, por ejemplo, como es comercializado por SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como Tritanrix™. La vacuna combinada puede comprender también otros antígenos, como antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), antígenos de virus de poliomielitis (por ejemplo, virus de poliomielitis inactivada trivalente - IPV), proteínas de membrana externa de *Moraxella catarrhalis*, proteínas de *Haemophilus influenza* no tipificables, proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B.

Los ejemplos de antígenos preferidos de proteínas de *Moraxella catarrhalis* que pueden incluirse en una vacuna combinada (especialmente para la prevención de otitis media) son: OMP106 [WO 97/41731 (Antex) y WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y/o LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [WO 97/13785 y WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); Omp1A1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); y OmpE. Los ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipificables que pueden ser incluidos en una vacuna combinada (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: proteína Fimbrina [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma [por ejemplo, fusiones de péptido LB1 (f); US 5843464 (OSU) o WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (Universidad del Estado de New York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); proteína D (EP 594610); P2; y P5 (WO 94/26304).

Otras combinaciones contempladas son los PS y proteína de neumococo de la invención en combinación con antígenos virales, por ejemplo, de influenza (atenuados, divididos, o subunidades [por ejemplo, glicoproteínas de superficie neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA). Véase, por ejemplo, Chaloupka I. et al, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127], RSV (por ejemplo, antígenos F y G o fusiones F/G, véase, por ejemplo, Schmidt A.C. et al, J Virol, Mayo de 2001, p4594 - 4603), PIV3 (por ejemplo, proteínas HN y F, véase Schmidt et al. supra), Varicela (por ejemplo, atenuada, glicoproteínas I-V, etc.), y cualquier (o todos) componente(s) de MMR (sarampión, paperas, rubéola).

Una vacuna combinada pediátrica preferida contemplada por la presente invención para el tratamiento global o la prevención de otitis media comprende: uno o más antígeno(s) polisacárido(s) de *Streptococcus pneumoniae* (preferentemente conjugado a proteína D), una o más proteínas de neumococo seleccionadas del grupo que consiste de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, (o el equivalente inmunológicamente funcional de las mismas, y uno o más antígenos expuestos en superficie de *Moraxella catarrhalis* y/o *Haemophilus influenzae* no tipificable. La proteína D puede usarse ventajosamente como un transportador proteico para que los polisacáridos de neumococo superen

problemas de supresión epitópica (como se mencionó anteriormente), y porque es en sí misma un inmunógeno capaz de producir protección mediada por células B contra *H. influenzae* (ntHi) no tipificable. Los antígenos de *Moraxella catarrhalis* o *Haemophilus influenzae* no tipificable pueden ser incluidos en la vacuna en forma de subunidades, o pueden añadir como antígenos presentes en la superficie de vesículas de membrana externa (ampollas) hechas a partir de la bacteria.

Preferentemente, las composiciones antigénicas (y vacunas) descritas anteriormente son liofilizadas hasta que están a punto de ser utilizadas, momento en el que son reconstituidas de forma extemporánea con el diluyente. Más preferentemente, son liofilizadas en presencia de 3D-MPL, y son reconstituidas de forma extemporánea con solución salina. Como alternativa, la proteína y el polisacárido pueden ser almacenados separadamente en un kit de vacunación (estando uno o ambos componentes liofilizados), los componentes se reconstituyen y mezclan antes de usar o se administran por separado al paciente. Un adyuvante Th1 (preferentemente 3D-MPL) puede estar presente en uno o ambos de los componentes.

La liofilización de vacunas es bien conocida en la técnica. Típicamente la vacuna líquida es liofilizada en presencia de un agente antiaglomerante, por ejemplo, azúcares como sacarosa o lactosa (presentes en una concentración inicial de 10-200 mg/ml). La liofilización se produce típicamente a través de una serie de etapas, por ejemplo, un ciclo que comienza a -69℃, ajuste gradual hasta -2 4℃ durante 3 horas, a continuación mantener esta t emperatura durante 18 horas, a continuación ajuste gradual a -16℃ durante 1 hora, a continuación mantener esta t emperatura durante 6 horas, a continuación ajuste gradual a +34℃ durante 3 horas, y finalmente mantener esta tem peratura durante 9 horas.

La liofilización de las composiciones da como resultado una composición más estable (por ejemplo, evita la descomposición de los antígenos polisacáridos). El procedimiento es también sorprendentemente responsable de un título de anticuerpos elevado contra los polisacáridos neumocócicos. Se ha demostrado que esto es particularmente significativo para los conjugados de PS 6B. Otro aspecto de la invención es por lo tanto una composición antigénica liofilizada que comprende un conjugado de PS 6B con adyuvante 3D-MPL (preferentemente carente de adyuvantes en base a aluminio) y una proteína neumocócica seleccionada del grupo que consiste de: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE,

Ejemplos

Los ejemplos ilustran pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Polisacárido capsular de S. pneumoniae:

La vacuna candidata 11-valente incluye los serotipos de polisacáridos capsulares 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F que fueron fabricados esencialmente como se describe en EP 72513. Cada polisacárido es activado y derivatizado utilizando química de CDAP (WO 95/08348) y conjugado con la proteína transportadora. Todos los polisacáridos son conjugados en su forma nativa, a excepción del serotipo 3 (que fue reducido en tamaño para disminuir su viscosidad).

Proteína transportadora:

La proteína transportadora seleccionada es la proteína recombinante D (PD) de Haemophilus influenzae no tipificable, expresada en E. coli.

Expresión de proteína D

Proteína D de *Haemophilus influenzae*

Construcción genética para la expresión de proteína D

Materiales iniciales

ADN que codifica proteína D

La proteína D está altamente conservada en *H. influenza* de todos los serotipos y cepas no tipificables. El vector pHIC348 que contiene la secuencia de ADN que codifica el gen de proteína D completa ha sido obtenido del Dr. A. Forsgren, Departamento de Microbiología Médica, Universidad de Lund, Hospital General de Malmö, Malmö, Suecia. La secuencia de ADN de la proteína D ha sido publicada por Janson *et al.* (1991) Infect. Immun. 59: 119-125.

Vector de expresión pMG1

El vector de expresión pMG1 es un derivado de pBR322 (Gross *et al.*, 1985) en el que se introdujeron elementos de control derivados del bacteriófago λ para la transcripción y traducción de genes extraños insertados (Shatzman *et al.*, 1983). Además, el gen de resistencia a Ampicilina se intercambió con el gen de resistencia a Kanamicina.

Cepa de E. coli AR58

La cepa de *E. coli* AR58 fue generada por transducción de N99 con una reserva de fago P1 cultivada previamente en un derivado SA500 (galE::TN10, lambdaKil cI857 ΔH1). N99 y SA500 son cepas de *E. coli* K12 derivadas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de Salud.

Vector de expresión pMG 1

Para la producción de proteína D, el ADN que codifica la proteína ha sido clonado en el vector de expresión pMG 1. Este plásmido utiliza señales de ADN de fago lambda para conducir la transcripción y traducción de genes extraños insertados. El vector contiene el promotor PL, operador de OL y dos sitios de utilización (NutL y Nutr) para aliviar los efectos de polaridad transcripcional cuando se proporciona la proteína N (Gross *et al.*, 1985). Los vectores que contienen el promotor PL son introducidos en un huésped de *E. coli* lisogénico para estabilizar el ADN del plásmido. Las cepas de huésped lisogénico contienen ADN de fago lambda defectuoso para la replicación integrado en el genoma (Shatzman *et al.*, 1983). El ADN de fago lambda cromosómico dirige la síntesis de la proteína represora cI que se une al represor OL del vector y evita la unión de la ARN polimerasa al promotor PL y por lo tanto la transcripción del gen insertado. El gen cI de la cepa de expresión AR58 contiene un mutante sensible a la temperatura de manera que la transcripción dirigida por PL puede ser regulada por un cambio de temperatura, es decir, un aumento de la temperatura del cultivo inactiva el represor y se inicia la síntesis de la proteína extraña. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas extrañas, en especial de aquellas que pueden ser tóxicas para la célula (Shimataka y Rosenberg, 1981).

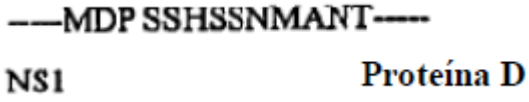
Cepa de E. coli AR58

La cepa de E. coli AR58 lisogénico utilizada para la producción del transportador proteína D es un derivado de la cepa N99 de NIH *E. coli* K12 estándar (F^-su-galK2, lacZ^-thr). Contiene un fago lambda lisogénico defectuoso (galE::TN10, lambdaKil$^-$cI857 Δ1). El fenotipo Kil$^-$ impide el cierre de la síntesis de macromoléculas del huésped. La mutación cI857 confiere una lesión sensible a la temperatura al represor de cI. La deleción ΔH1 elimina el operón derecho del fago lambda y los loci bio, uvr3 y ch1A de los huéspedes. La cepa AR58 fue generada por transducción de N99 con una reserva de fago P1 cultivada previamente en un derivado SA500 (galE::TN10, lambdaKil$^-$ cI857 ΔH1). La introducción del lisógeno defectuoso en N99 fue seleccionada con tetraciclina en virtud de la presencia de un transposón TN10 que codifica para resistencia a tetraciclina en el gen galE adyacente.

Construcción del vector pMGMDPPrD

El vector pMG 1 que contiene el gen que codifica la proteína S 1 no estructural del virus de Influenza (pMGNSI) se utilizó para construir pMGMDPPrD. El gen de la proteína D fue amplificado por PCR a partir del vector pHIC348 (Janson *et al.* 1991) con cebadores de PCR que contienen los sitios de restricción NcoI y XbaI en los extremos 5' y 3', respectivamente. El fragmento NcoI/XbaI fue introducido a continuación en pMGNS1 entre NcoI y XbaI creando así una proteína de fusión que contiene 81 aminoácidos del N-terminal de la proteína NS1 seguidos por la proteína PD. Este vector fue rotulado pMGNS1PrD.

Sobre la base de la construcción se ha descrito anteriormente se generó la construcción final para la expresión de la proteína D. Se eliminó un fragmento BamHI/BamHI de pMGNS1PrD. Esta hidrólisis de ADN elimina la región de codificación NS1, a excepción de los primeros tres primeros residuos N-terminales. Con el reenlace del vector se ha generado un gen que codifica una proteína de fusión con la siguiente secuencia de aminoácidos N-terminal:



La proteína D no contiene un péptido líder o la cisteína N-terminal a la que las cadenas de lípidos están normalmente unidas. La proteína por lo tanto no se excreta en el periplasma ni es lipidada y permanece en el citoplasma en una forma soluble.

La construcción final pMG-MDPPrD se introdujo en la cepa huésped AR58 por choque térmico a 37℃. Las bact erias que contienen el plásmido fueron seleccionadas en presencia de Kanamicina. La presencia del inserto de ADN que codifica la proteína D se demostró por digestión de ADN de plásmido aislado con endonucleasas seleccionadas. La cepa de *E. coli* recombinante se conoce como ECD4.

La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor lambda P_L/Operador O_L. La cepa huésped AR58 contiene un gen cI sensible a la temperatura en el genoma que bloquea la expresión de lambda P_L a baja

temperatura mediante la unión a O_L. Una vez que la temperatura se eleva, cI se libera de O_L y se expresa la proteína D. Al final de la fermentación las células se concentran y congelan.

La extracción de las células cosechadas y la purificación de la proteína D se realizó de la siguiente manera. El pellet de cultivo de células congelado se descongela y resuspende en una solución de ruptura celular (tampón citrato de pH 6,0) a una OD_{650} final = 60. La suspensión se pasa dos veces a través de un homogeneizador de alta presión a P = 1000 bar. El homogenato de cultivo celular es clarificado por centrifugación y los restos celulares se eliminan por filtración. En la primera etapa de purificación el lisado filtrado se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharosa Flujo Rápido). PD se une a la matriz del gel por interacción iónica y se eluye con un incremento gradual de la fuerza iónica del tampón de elución.

En una segunda etapa de purificación las impurezas son retenidas en una matriz de intercambio aniónico (Q Sepharose Flujo Rápido). PD no se une al gel y se pueden recolectar en el flujo dinámico.

En ambas etapas de cromatografía en columna la recolección de la fracción es monitoreada mediante OD. El flujo dinámico de la cromatografía en columna de intercambio aniónico que contiene la proteína purificada D se concentra por ultrafiltración.

El retentado de ultrafiltración que contiene la proteína D pasa finalmente a través de una membrana de 0,2 um.

Química:

Activación y química de acoplamiento:

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

A partir de una solución de reserva de 100 mg/ml en acetonitrilo, se añadió CDAP (relación CDAP/PS 0,75 mg/mg PS) a la solución de polisacárido. Después de 1,5 minutos, se añadió trietilamina 0,2 M para obtener el pH de activación específico. La activación del polisacárido se llevó a cabo a este pH durante 2 minutos a 25℃. Se añadió proteína D (la cantidad depende de la relación PS/PD inicial) al polisacárido activado y se realizó la reacción de acoplamiento al pH específico durante 1 hora. La reacción se inactivó posteriormente con glicina durante 30 minutos a 25℃ y durante una noche a 4℃.

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

Se determinó el contenido de carbohidrato y proteína de las fracciones eluidas. Los conjugados fueron agrupados y esterilizados por filtración en una membrana de esterilización de 0,22 um. Se determinaron las relaciones PS/proteína en las preparaciones de conjugado.

Caracterización:

Cada conjugado fue caracterizado y cumplió las especificaciones descritas en la Tabla 2. El contenido de polisacárido (µg/ml) se midió mediante la prueba de Resorcinol y el contenido de proteína (µg/ml) mediante la prueba de Lowry. La relación final PS/PD (p/p) se determina mediante la relación de las concentraciones.

Contenido residual de DMAP (ng/µg PS):

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

Contenido de polisacárido libre (%):

Se determinó el contenido de polisacárido libre de los conjugados mantenidos a 4℃ o almacenados 7 días a 37℃ en el sobrenadante obtenido después de la incubación con anticuerpos α-PD y sulfato de amonio saturado, seguido por una centrifugación.

Se utilizó ELISA α-PS/α-PS para la cuantificación de polisacárido libre en el sobrenadante. La ausencia de conjugado fue controlada también mediante un ELISA α-PD/α-PS. La reducción de la cantidad de resultados de polisacárido libre da como resultado una vacuna conjugada mejorada.

Antigenicidad:

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

Contenido de proteína libre (%):

El nivel de de proteína D "libre" residual se determinó utilizando un procedimiento con tratamiento con SDS de la muestra. El conjugado se calentó 10 minutos a 100℃ en presencia de SDS 0,1% y se inyectó en una columna de filtración en gel SEC-HPLC (TSK 3000-PWXL). Como la proteína D es un dímero, hay un riesgo de sobreestimar el nivel de proteína D "libre" por disociación de la estructura con SDS.

Tamaño molecular (K_{av}):

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

Estabilidad:

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

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

Los conjugados de proteína pueden ser adsorbidos en fosfato de aluminio y agrupados para formar la vacuna final.

Conclusión:

Se han producido conjugados inmunogénicos, que se ha demostrado que son componentes de una vacuna prometedora. Se descubrieron las condiciones de CDAP optimizadas para el producto polisacárido neumocócico conjugado de mejor calidad final para cada una de las 11 valencias.

Tabla 1

Condiciones de activación específica/acoplamiento/desactivación de conjugados de PS de S. pneumoniae – Proteína D

Serotipo	1	3 (µfluid.)	4	5	6B	7F
Concentración de PS (mg/ml)	2,0	3,0	2,0	7,5	5,4	3,0
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	H_2O	H_2O	NaCl 2M	NaCl 2M
Concentración de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Relación PS/PD inicial (p/p)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Concentración de CDAP (mg/ml PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
$pH_a = pH_c = pH_q$	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0

Serotipo	9V	14	18C	19F	23F
Concentración de PS (mg/ml)	2,5	2,5	2,0	4,0	3,3
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	H_2O	NaCl 2M	NaCl 2M
Concentración de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Relación PS/PD inicial (p/p)	1/0,75	1/0,75	1/1	1/0,5	1/1
Concentración de CDAP (mg/ml PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
$pH_a = pH_c = pH_q$	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	10,0/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0

Tabla 2: Especificaciones de la vacuna 11-valente neumocócica de PS-PD (los primeros números del código de lote indican el serotipo)

Criterios	D01PDJ227	D03PDJ236	D4PDJ228	D5PDJ235	D6PDJ209	
Relación PS/Prot (p/p)	1/0,66	1/1,09	1/0,86	1/0,86	1/0,69	
Contenido de polisacárido libre (%) <10%	1	1	7	9	0	
Contenido de proteína libre (%) <15%	8	<1	19	21	9	
Contenido de DMAP (ng/µg PS) <0,5 ng/µg PS	0,2	0,6	0,4	1,2	0,3	
Tamaño molecular (K_{av})	0,18	0,13	0,12	0,11	0,13	
Estabilidad	sin cambio	sin cambio	sin cambio	cambio bajo	sin cambio	
	D07PDJ225	D09PDJ222	D14PDJ202	D18PDJ221	D19PDJ206	D23PDJ212
Relación PS/Prot (p/p)	1/0,58	1/0,80	1/0,68	1/0,62	1/0,45	1/0,74
Contenido de polisacárido libre (%) <10%	1	<1	<1	4	4	0
Contenido de proteína libre (%) <15%	8	0,3	3	21	10	12
Contenido de DMAP (ng/µg PS) <0,5 ng/µg PS	0,1	0,6	0,3	0,2	0,1	0,9
Tamaño molecular (K_{av})	0,14	0,14	0,17	0,10	0,12	0,12
Estabilidad	sin cambio	sin cambio	sin cambio	sin cambio	cambio bajo	sin cambio

Ejemplo 2 - Impacto beneficioso de la adición de una o más de las proteínas de neumococo de la invención +/- 3D-MPL sobre la efectividad protectora de la vacuna de polisacárido 11-valente conjugada con PD contra colonización pulmonar neumocócica en ratones

Lecturas inmunológicas

Dosificación por ELISA de IgG sérica específica para proteína neumocócica

Se recubren inmunoplacas Maxisorp Nunc durante 2 horas a 37℃ con 100 µl/pocillo de 2 µg/ml de proteína diluida en PBS. Las placas se lavan 3 veces con NaCl 0,9% tampón Tween-20 0,05%. Posteriormente, se realizan diluciones seriadas de dos veces (en PBS/Tween-20 0,05%, 100 µl por pocillo) de una referencia de suero anti-proteína añadida como una curva estándar (a partir de 670 ng/ml de IgG) y muestras de suero (a partir de una dilución 1/10) se incuban durante 30 minutos a 20℃ con agitación. Después de lavar como se describió anteriormente, se incuba IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa (Jackson) diluida 5000 veces en PBS/Tween-20 0,05% (100 µl/pocillo) durante 30 minutos a 20℃ con agitación. Después del lavado, las placas se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de tampón de revelado (OPDA 0,4 mg/ml y H_2O_2 0,05% en tampón citrato 100 mM pH 4,5). El revelado se detiene añadiendo 50 µl/pocillo de HCl 1N. Las

densidades ópticas se leen a 490 y 620 nm mediante el uso de un inmunolector Emax (Molecular Devices). El título del anticuerpo se calcula por el procedimiento matemático de 4 parámetros utilizando un software Soft-MaxPro.

Ensayo de opsonofagocitosis

El propósito de este ensayo es medir en forma reproducible la capacidad de opsonización de muestras de suero de prueba contra serotipos de *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F utilizando un procedimiento adaptado del procedimiento publicado estandarizado del CDC (Steiner et al, Clínical and Diagnostic Laboratory Immunology 4: 415. 1997).

Este ensayo reproduce *in vitro* lo que ocurre *in vivo* como mecanismo primario de eliminación de *Streptococcus pneumoniae* o neumococos invasivos. Esto es la opsonización de los neumococos seguida por fagocitosis y después la muerte. “Fagocitosis” es el procedimiento por el cual las células engloban material y lo encierran dentro de una vacuola (fagosoma) en el citoplasma. Los neumococos son eliminados cuando son fagocitados por fagocitos de mamíferos sanos. “Opsonización” es el procedimiento por el cual la fagocitosis es facilitada por el depósito de opsoninas, por ejemplo, anticuerpo y complemento, en el antígeno.

Ha habido numerosos ensayos opsonofagocíticos reportados en la literatura. El procedimiento estandarizado del CDC se examinó en un contexto multi-laboratorio (Steiner et al, ICAAC, 16 al 20 de septiembre, 2000, Toronto). Este último ensayo fue adaptado en SB ya que proporcionó una base para la comparación con otros laboratorios, utilizó reactivos y controles que están disponibles generalmente, y expresó los resultados como el título (dilución) de suero capaz de facilitar la eliminación de 50% de neumococos viables, una unidad que se utiliza comúnmente para este tipo de ensayo. De hecho, se demostró que el ensayo adaptado podía generar resultados que se correspondían bastante bien con otros 4 laboratorios (Steiner et al, ICAAC, 16 al 20 septiembre, 2000, Toronto).

La célula fagocítica utilizada en el ensayo es la línea celular HL60, que se originó de un individuo con leucemia promielocítica y fue establecida como una línea celular continua por Collins et al. en 1977 (270 Nature: 347-9). Esta línea celular se compone de células hematopoyéticas indiferenciadas, es decir el 85% de blastocitos y promielocitos, 6% de mielocitos y 9% de células diferenciadas. Los compuestos polares pueden inducir la diferenciación de las células en al menos dos linajes diferentes. La N,N-dimetilformamida induce diferenciación granulocítica que produce células de tipo polimorfonuclear (44% de mielocitos y metamielocitos y 53% de PMN en bandas y segmentados).

En la Versión A2 del ensayo, los sueros a examinar son inactivados por calor y se realizan 8 diluciones seriadas de dos veces a partir 1/4 en microplacas de 96 pocillos en medio HBSS que contiene 0,3% de BSA. El volumen final de suero diluido en cada pocillo es 25 µl.

Se mezclan cuatro volúmenes de células HL60 a 10^7 células/ml (5 o 6 días después de la diferenciación con Dimetilformamida), dos volúmenes de bacterias *S. pneumoniae* (a la dilución apropiada) y un volumen de complemento de conejo bebé inmediatamente antes de su uso y se añade 25 µl de la mezcla a cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos que contiene el suero diluido. Para los serotipos 1 y 6B, la cantidad de complemento se incrementa hasta 12,5% de la concentración final, dando la Versión A3 del ensayo.

Después de dos horas de incubación a 37ºC bajo agitación orbital, la placa se coloca en hielo a fin de detener la reacción de opsonofagocitosis.

Se realiza una estimación de las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada pocillo por incubación durante una noche a 37ºC. El “título de opsonización” (TO) se define como la recíproca de la dilución del suero capaz de reducir en al menos un 50% el número de bacterias *S. pneumoniae* en los pocillos (es decir, 50% de eliminación). La eliminación % se calcula mediante la siguiente fórmula:

Eliminación % = (UFC media en pocillos de control - UFC muestra) / UFC media en pocillos de control x 100

Desafío intranasal con neumococo en ratones OFI

Se inoculan ratones OF1 hembras de siete semanas de edad por vía intranasal bajo anestesia con UFC 5.10’ de *S. pneumoniae* adaptado a ratón serotipo 2, 4 o 6B. Se extraen los pulmones a las 6 horas después del desafío y se homogeneízan (Ultramax, 24000 rpm, 4ºC) en medio Caldo Todd Hewith (THB, Gibco). Se plaquean diluciones seriadas de 10 veces de los homogeneizados de pulmón durante una noche a 37ºC en placas de Petri que contienen agar THB suplementado con extracto de levadura. La infección pulmonar neumocócica se determina como el número de UFC/ratón, expresada como promedio ponderado logarítmico. El límite de detección es 2,14 log UFC/ratón.

Ejemplo 2A *Efecto del adyuvante 3D-MPL sobre la respuesta inmune anti-proteína*

En el presente ejemplo, podemos evaluar el impacto del adyuvante 3D-MPL sobre la respuesta inmune a la proteína de la invención.

Se inmunizan por vía intramuscular grupos de 10 ratones Balb/c de 6 semanas de edad en los días 0, 14 y 21 con 1 µg de proteína contenida en A: AlPO4 100 µg, o B: AlPO4 100 µg + 5 µg de 3D-MPL (monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, suministrado por Ribi Immunochem). Se mide la IgG por ELISA en suero post-III.

Cualquiera que sea el antígeno, puede demostrarse que la mejor respuesta inmune es inducida en animales vacunados con formulaciones suplementadas con 3D-MPL.

Ejemplo 2B *Impacto beneficioso de la adición de una proteína de la invención +/- adyuvante 3D-MPL sobre la efectividad protectora de la vacuna de polisacárido 11-valente conjugada con PD contra la colonización pulmonar neumocócica en ratones OF1 sometidos a desafío por vía intranasal con serotipo 2,4 y 6B.*

En el presente ejemplo, podemos evaluar la eficacia profiláctica de la vacuna que contiene el conjugado polisacárido 11-valente-proteína D, una proteína de la invención y adyuvantes AlP04 + 3D-MPL, en comparación con la formulación clásica de conjugado de polisacárido 11-valente - proteína D adsorbida en AlPO4.

Se inmunizan grupos de 12 ratones OF1 hembras de 4 semanas de edad por vía subcutánea en los días 0 y 14 con formulaciones que contienen A: 50 µg de AlPO4; B: 0,1 µg de vacuna de polisacárido 11-valente conjugada con PS/serotipo de PD + 50 µg de AlPO4; o C: 0,1 µg de vacuna de polisacárido 11-valente conjugada con PS/serotipo de PD + 10 µg de proteína de la invención + 50 µg de AlPO4 + 5 µg de 3D-MPL (suministrado por Ribi Immunochem). El desafío se realiza en el día 21 como se describió anteriormente.

Como puede demostrarse mediante este procedimiento, una protección significativa es conferida por la vacuna conjugada con polisacárido 11-valente suplementada con la proteína de la invención y con adyuvante AlPO4 + MPL. Por el contrario, no se observa una protección significativa en animales inmunizados con la formulación de conjugado de polisacárido 11-valente/AlPO4. Este resultado puede demostrar que la adición de la proteína de la invención y el adyuvante 3D-MPL aumenta la eficacia de la vacuna conjugada con polisacárido 11-valente contra la neumonía.

Ejemplo 2C, *correlaciones inmunológicas de la protección mostrada en el Ejemplo 2b*

Con el fin de establecer las correlaciones inmunológicas de protección conferidas en el ejemplo 2B por la vacuna conjugada con polisacárido 11-valente suplementada con una proteína de la invención y 3D-MPL, pueden medirse las respuestas serológicas de anticuerpos pre-desafío al polisacárido 2, 4 o 6B, y la proteína de la invención como se describió anteriormente.

Los títulos de anticuerpos se comparan entonces con los números de colonias de bacterias medidos en los pulmones de los animales correspondientes recolectados a las 6 horas después del desafío. Se calcularon los R^2 en regresiones lineales log/log.

El R^2 calculado puede mostrar la ausencia de correlación entre las respuestas inmunes humorales y la protección para ambos antígenos. Los títulos de anticuerpos anti-6B (o 2 o 4) no son significativamente diferentes en los grupos inmunizados con la vacuna conjugada 11-valente o con la misma vacuna suplementada con la proteína de la invención y 3D-MPL. Por lo tanto, la mejora de la protección observada con la formulación C no se debe exclusivamente a una mayor respuesta de anticuerpos contra el polisacárido 6B (o 2 o 4).

En conjunto, los resultados pueden sugerir que la protección no está mediada por la respuesta inmune humoral sola, sino que también por una inmunidad mediada por células inducida por el antígeno proteico (preferentemente en presencia de 3D-MPL). Esto puede dar un apoyo adicional a la adición de antígeno(s) proteico(s) y adyuvante(s) potente(s) en la vacuna conjugada con polisacárido neumocócico, de modo de coordinar ambas ramas del sistema inmune para una protección óptima.

Ejemplo 3 - La cooperación de ambas ramas del Sistema Inmune en ratones inmunizados activamente con una proteína de la invención e inmunizados pasivamente con anticuerpos contra PS de neumococo

Ejemplo 3A - Determinar la concentración de anticuerpo anti-polisacárido 6B (anti-PS) administrado pasivamente que protege contra la neumonía

Procedimiento

Grupos de vacunas: Cuatro grupos de 16 ratones fueron inmunizados pasivamente (i.p.) en el día -1 con 100 µl de antisuero anti-polisacárido de rata sin diluir de acuerdo con los grupos detallados a continuación. (64 ratones en total)

Grupo	Especificidad	Concentración de IgG en el antisuero
G1	α-PS-6B	5 µg/ml
G2	α-PS-6B	2 µg/ml
G3	α-PS-6B	0,75 pg/ml
G4	Control	0 µg/ml

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

Anestesia: Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (3%) más 02(1 L/min).

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

Infección: En el día 0 los ratones fueron anestesiados como se describió anteriormente e infectados con *S. pneumoniae* N1387 (50 µl de suspensión bacteriana enfriada) por instilación intra-bronquial a través de intubación traqueal no quirúrgica. Este procedimiento fue descrito por Woodnut y Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43:29 (1999)).

Muestras: En el día 3 post-infección, 8 ratones/grupo fueron sacrificados por sobredosis de CO_2 y los pulmones fueron extirpados y homogeneizados en 1 ml de PBS. Se prepararon diluciones seriadas de diez veces en PBS para determinar el número de bacterias viables. Las muestras fueron inoculadas (20 µl) por triplicado en placas de TSA suplementado con sangre de caballo 5% e incubadas durante una noche a 37℃ antes de la evaluación. Otr os grupos de ratones fueron sacrificados en el día 7 y muestreados como el anterior.

Resultados:

Concentración de IgG (µg/ml) en suero de rata	Números de bacterias (log 10 ufc/lpulmones) en días post-infección	
	3	8
5	6,7 ± 0,7 (1/7)	7,2 ± 0,7 (5/8)
2	6,5 ± 0,7 (1/7)	6,9 ± 1,8 (4/7)
0,75	7,7 ± 0,5 (5/8)	4,8 ± 1,4 (2/8)
0	6,7 ± 1,5 (3/6)	6,3 ± 1,5 (3/9)

Las cifras entre paréntesis son números de animales que murieron antes del momento del muestreo.

Conclusión: En general, no hubo diferencia significativa en el número de bacterias aisladas de cualquiera de los grupos de tratamiento. Esto indica que el anticuerpo anti-polisacárido no confirió protección medible en concentraciones de hasta e incluyendo 5 µg/ml.

Esto es similar a lo que se observa en algunos ensayos clínicos en humanos, es decir, el anticuerpos anti-polisacárido no es suficiente para proteger contra la neumonía neumocócica en algunas poblaciones.

Ejemplo 3B - Determinar la protección contra la neumonía ofrecida por administración activa de una proteína de la invención, con o sin adyuvante, y la sinergia con anticuerpo anti-PS sub-óptimo.

Procedimiento

Animales: 128 ratones CD-1 machos (6 semanas de edad a la vacunación, 10 semanas de edad a la infección) de Charles River, St. Constant, Quebec, Canadá. Los animales pesaron aproximadamente 20 gramos a las 6 semanas y 38 gramos a las 10 semanas.

Inmunizaciones: Se inmunizan seis grupos de 16 ratones por inyección subcutánea en los días -22 y -14 con 100 µl de vacuna como se detalla a continuación. (128 ratones en total). El 3D-MPL se obtiene de Ribi/Corixa.

En el día -1, se inmunizan pasivamente grupos específicos (véase la Tabla a continuación) (i.p. 100 µl) con una concentración de 4,26 µg/ml (4 ml de 5 µg/ml + 1,3 ml de 2 µg/ml) de anticuerpo anti-polisacárido de ratón.

Grupo	Volumen de inyección - Activa	Vacuna administrada los días -22, -14 (Dosis µg)	Volumen de inyección - Pasiva	IgG pasiva (día -1)
1-1	100 µl s.c.	Proteína/AlPO4 (10/50)		Ninguna
1-2	100 µl s.c.	Proteína/MPUAlPO4 (10/5/50)		Ninguna
1-3	100 µl s.c.	Proteína/AlPO4 (10/50)	100 µl i.p.	α-PS
1-4	100 µl s.c.	Proteína/MPL/AlPO4 (10/5/50)	100 µl i.p.	α-PS
1-5	100 µl s.c.	MPL/AlPO4 (5/50)	100 µl i.p.	α-PS
1-6	100 µl s.c.	MPL/AlPO4 (5/50)		Ninguna

Infección: En el día 0, los ratones son anestesiados (3% isoflurano más 1 L/min de O_2). Se preparan inóculos bacterianos cosechando un crecimiento de *S. pneumoniae* N1387 (serotipo 6) de placas de agar tripticasa soja (TSA) suplementado con sangre de caballo 5% y suspendiendo en 6 ml de PBS. Se prepara una dilución de diez veces (1 ml más 9 ml) en agar nutritivo fundido y enfriado (mantenido a 41℃) inmediatamente antes de la infección. Los ratones son infectados por instilación intra-bronquial a través de intubación traqueal y reciben aproximadamente 6,0 log10 ufc/ratón en un volumen de 50 µl. Este procedimiento fue descrito por Woodnut y Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap 43: 29 (1999)).

Muestras: A las 72 horas post-infección, se sacrificaron 8 ratones/grupo por sobredosis de CO_2 y los pulmones fueron extirpados y homogeneizados en 1 ml de PBS. Se prepararon diluciones seriadas de diez veces en PBS para determinar el número de bacterias viables. Las muestras se inoculan (20 µl) por triplicado en placas de TSA suplementadas con sangre de caballo 5% y se incuban durante una noche a 37℃ antes de la evaluación. O tros grupos de ratones son sacrificados en el día 8 post-infección y muestrados como el anterior.

Análisis de los datos

La medida de resultado para la comparación del tratamiento es el número de bacterias en los pulmones a los 3 y 7 días después de la infección. Los resultados pueden ser presentados como medias de grupos con desviaciones estándar. El análisis estadístico debe realizarse utilizando la prueba t de Student en la que un valor de $P < 0,05$ se considera significativo.

Como se demostró anteriormente, puede mostrarse que el anticuerpo anti-polisacárido solo (Grupo 1-5) no brinda protección contra el crecimiento de neumococos en el pulmón. La proteína neumocócica con adyuvante AlPO4 (Grupo 1-1) puede no conferir protección tampoco, pero lo hará en un grado mayor cuando la Proteína se combina con 3D-MPL (Grupo 1-2).

Puede observarse una protección más significativa en grupos con anticuerpo anti-polisacárido y proteína, particularmente en el grupo que tiene los tres elementos, Proteína, 3D-MPL y anticuerpo anti-polisacárido administrado pasivamente (Grupo 1-4). Esta conclusión también puede ser apoyada por la tasa de mortalidad. Los Grupos 1-3 y, en particular, 1-4 tendrán menos muertes en comparación con los otros grupos.

Conclusión:

A medida que el experimento se lleva a cabo con animales inmunizados pasivamente, el efecto sinérgico de inmunizar también de forma activa con proteínas (+/- MPL) no puede deberse a un aumento en el nivel de anticuerpos contra el antígeno polisacárido.

Puede observarse protección significativa contra la neumonía neumocócica en grupos inmunizados con proteína más anticuerpo anti-polisacárido administrado pasivamente, particularmente si también está presente 3D-MPL, lo que indica la sinergia de esta combinación.

Si la inmunización anti-polisacárido se lleva a cabo activamente (preferentemente con polisacárido conjugado), este efecto será aún más marcado, como el efecto de las células B de memoria, y los niveles constantes de anticuerpo anti-PS durante todo el experimento contribuirán a la cooperación de la respuesta inmune.

Ejemplo 4 - Procedimiento para determinar sinergia mediante la correlación de la protección

El mecanismo principal de protección que el organismo humano utiliza para eliminar la infección neumocócica es la opsonofagocitosis mediada por anticuerpos (Bruyn et al Clin Infect Dis 14: 251 (1992)). Si bien se han desarrollado varios procedimientos de ELISA para medir la concentración de anticuerpo contra el polisacárido capsular como una correlación de la protección, se ha hecho evidente que el ensayo de opsonofagocitosis *in vitro* es una mejor correlación de la protección (Musher et al J. Infect Dis 182: 158 (2000)).

Las proteínas neumocócicas de la invención proporcionan protección contra la infección neumocócica por mecanismos que son diferentes de opsonofagocitosis mediada por anticuerpos. En el ejemplo 2, la inmunización activa con conjugados y proteína puede mostrar un efecto sinérgico, que no puede explicarse por las diferencias de concentración del anticuerpo ya que son las mismas en ambos grupos. Por lo tanto, la protección residual que puede observarse proviene de un efecto sinérgico. Del mismo modo, como el anticuerpo se añade pasivamente, puede llegarse a la misma conclusión en el ejemplo 3.

En muchos casos, las proteínas de neumococo de la invención están asociadas a la superficie, y se espera que proporcionen alguna actividad de opsonización por sí mismas. En este caso es posible distinguir el mecanismo de protección a través de una medida cuantitativa de la capacidad de opsonización de la proteína anti-neumocócica, que puede ser usada para estimar la contribución relativa de la actividad de opsonización a otros mecanismos sinérgicos de protección.

En el modelo de ratón de colonización pulmonar, la protección relativa de cada vacuna puede estimarse a partir de la eliminación de bacterias de los pulmones. O alternativamente, la eficacia de la vacuna puede estimarse a partir de las tasas de casos, como normalmente se determina para las vacunas.

Protección % = (UFC/Control pulmón - UFC/Vacuna pulmón) / (UFC/Control pulmón)

Eficacia % = (Casos Control – Casos Vacuna) / (Casos Control)

Determinar la parte de protección o eficacia que se origina a partir del efecto sinérgico, es una cuestión de determinar qué parte de la eficacia cabría esperar sobre la base de la relación de los títulos de opsonización.

En el Ejemplo 3 anterior, el % de protección por la combinación se debe a la sinergia entre los componentes proteína/anticuerpo ya que ni las proteínas ni el anticuerpos anti-polisacárido solos pueden brindar mucha protección por sí mismos.

Es posible estimar la cantidad de protección del efecto sinérgico sobre la base de la actividad de opsonización relativa. Si la actividad de opsonización proporcionada por un anticuerpo anti-polisacárido capsular es X, y la actividad de opsonización proporcionada por un anticuerpos anti-proteína neumocócica es Y, entonces puede demostrarse que la actividad de opsonización total es X + Y, y la parte relativa de la actividad de opsonización de la proteína sería Y/X + Y. Esto se compara con la eficacia protectora relativa de una vacuna, en la que la parte anti-polisacárido de la vacuna proporciona una eficacia protectora de A%, y la eficacia protectora de la vacuna de polisacárido más proteína es B%. La eficacia adicional que no puede ser representada por la actividad de opsonización se estima entonces como

Actividad Protectora Residual (Sinergia) = B% - A% - B%* (Y/X + Y)

Este ejemplo no pretende limitar las formas de estimar el efecto sinérgico. Una vez que se hayan identificado otras correlaciones de protección, estas podrían utilizarse para estimar este efecto sinérgico.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende al menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y al menos un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo consistente en: PhtA, PhtD, PhtB y PhtE o su equivalente inmunológicamente funcional.

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 en la que el antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* es PhtD.

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2 que comprende además Ply.

4. La composición inmunogénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el antígeno polisacárido se presenta en forma de un conjugado de polisacárido-proteína transportadora.

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que la proteína transportadora se selecciona del grupo que consiste de: Toxoide diftérico, Toxoide tetánico, CRM197, Hemocianina de Lapa Californiana (KLH), derivado de proteína de Tuberculina (PPD), y proteína D de *H. influenzae*.

6. Una composición inmunogénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que la vacuna comprende al menos cuatro antígenos polisacáridos neumocócicos de serotipos diferentes.

7. Una composición inmunogénica como se reivindica en las presentes reivindicaciones que además comprende un adyuvante.

8. Una composición inmunogénica como se reivindica en la reivindicación 7, en la que el adyuvante comprende una sal de aluminio.

9. Una composición inmunogénica como se reivindica en la reivindicación 7, en la que el adyuvante es un inductor preferencial de una respuesta Th1.

10. Una composición inmunogénica como se reivindica en la reivindicación 9, en la que el adyuvante comprende al menos uno de los siguientes: 3D-MPL, una saponina inmunoestimulante, o un oligonucleótido CpG inmunoestimulante.

11. Una composición inmunogénica como se reivindica en la reivindicación 10, en la que el adyuvante comprende un transportador seleccionado del grupo que comprende: una emulsión de aceite en agua, liposomas y una sal de aluminio.

12. Una composición inmunogénica como se reivindica en las presentes reivindicaciones para su uso como medicamento.

13. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-11.

14. El uso de un antígeno polisacárido de neumococo en combinación con un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, y opcionalmente un adyuvante que induce TH1, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la neumonía en pacientes de más de 55 años.

15. El uso de un antígeno polisacárido de neumococo en combinación con un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB y PhtE, y opcionalmente un adyuvante que induce TH1, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la otitis media en bebés o niños pequeños.

16. Un procedimiento para fabricar una composición inmunogénica como se reivindica en las presentes reivindicaciones, que comprende las etapas de:

seleccionar uno o más antígeno(s) polisacárido(s) de neumococo;

seleccionar uno o más antígeno(s) proteico(s) de neumococo del grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB y PhtE; y

mezclar dichos antígenos polisacáridos y proteicos con un excipiente adecuado.