

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 648**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06806904 .6**
96 Fecha de presentación: **29.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1928418**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **COMPOSICIONES DE VACUNAS LIPOSÓMICAS QUE COMPRENDEN UN ANTÍGENO
POLISACÁRIDO Y UN ADYUVANTE PROTEICO.**

30 Prioridad:
30.09.2005 EP 05256160

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.02.2012

73 Titular/es:
**LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED
LONDON BIOSCIENCE INNOVATION CENTRE 2
ROYAL COLLEGE STREET
LONDON NW1 0NH, GB**

72 Inventor/es:
**BACON, Andrew David;
GREGORIADIS, Gregory y
LAING, Peter**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 374 648 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

Composiciones de vacunas liposómicas que comprenden un antígeno polisacárido y un adyuvante proteico.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a composiciones liposómicas, en particular composiciones útiles para provocar una respuesta inmune contra antígenos polisacáridos, en particular derivados de microbios patógenos, como los antígenos polisacáridos neumocócicos y Hib.
- 10 **[0002]** Las infecciones bacterianas causadas por bacterias encapsuladas son un problema de salud mundial importante. Es difícil vacunar contra las especies *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* debido a la naturaleza timo independiente de los principales antígenos de superficie, los polisacáridos capsulares.
- 15 **[0003]** Los antígenos independientes de las células T presentan problemas particulares en referencia al desarrollo de vacunas efectivas. La producción de anticuerpos es baja y no es normalmente estimulada por la re-inmunización. Los isotipos de anticuerpos están restringidos a IgM y otros isotipos tienen generalmente de baja afinidad para un antígeno específico.
- 20 **[0004]** Un gran problema reside en la respuesta de los niños pequeños a las vacunas independientes de las células T. Estos individuos están entre los más vulnerables a tales infecciones bacterianas. Este grupo de edad responde en la más pobremente a los antígenos independientes de las células T.
- 25 **[0005]** Se han intentado varios métodos para adyuvantar antígenos polisacáridos. Por ejemplo, los polisacáridos han sido conjugados a proteínas portadoras como el toxoide tetánico, lo que resulta en alguna mejora en el efecto inmunogénico. Los polisacáridos han sido alternativamente formulados con liposomas, lo que también da una respuesta inmune mejorada.
- 30 **[0006]** Burgeot, C y otros en Vaccine 2001, 19, 2092-2099, revela la inmunopotenciación de vacunas polisacáridos del *Staphylococcus aureus* co-atrapada en liposomas con toxina alfa. Los liposomas fueron formados de liposoma formando compuestos que contenían fosfatidilcolina de huevo, estearilamina y colesterol en proporciones molares de 7:2:1. Los liposomas fueron formados usando el método de deshidratación rehidratación, con deshidratación de una mezcla de SUV vacío y antígenos suspendidos en 10 mM de Hepes (pH 7.4), 150mM de regulador de cloruro de sodio. La proporción de polisacáridos a proteína de toxina osciló de 20 a 5. La toxina alfa es una sustancia altamente tóxica y es hemolítica. Los autores razonaron que su actividad al potenciar la antigenicidad del antígeno polisacárido es dependiente de las propiedades que muestra como una toxina involucrada en la perforación de la membrana celular. Muestran que la potenciación no se consigue con derivados de toxina inactivados por calor. La toxina alfa tiene un peso molecular de la subunidad de alrededor de 33 kDa.
- 35 **[0007]** Pietrobon, P.J.F. y otros en Immunomethods 4, 236-243 (1994) describen en co-atrapamiento en liposomas de LPS antígenos T independientes (que nos son solubles en agua) y un polipéptido con sitios de reconocimiento de células T, hemaglutinina (HA). No se revelan los tamaños del liposoma. La proporción de peso de LPS a HA está en el intervalo de 2:1 a 1:10. Los liposomas se hacen formando una capa lipídica que contiene LPS y HA e hidratándola en líquido en suspensión acuosa que contiene n-octilglucopiranosida. La HA no es inerte, pero enlaza a varios receptores de la superficie de la célula por el ácido siálico que tiene glicoles y estimula una respuesta inmune innata. Los compuestos que estimulan una respuesta inmune innata pueden generar una inflamación no deseable.
- 40 **[0008]** De acuerdo a la invención se proporciona una nueva composición liposómica como se define en la reivindicación 1.
- 45 **[0009]** En la invención, el término "coatrapado" significa que dos activos, concretamente el antígeno polisacárido y el portador proteico, deben estar asociados con el mismo liposoma. Los activos están al menos atrapados en parte en el espacio intravesicular de los liposomas. Ambos activos deben ser solubles en agua y ubicados en consecuencia en la fase acuosa de las formulaciones liposómicas. Donde los liposomas son multi-lámina los activos pueden estar entre las láminas.
- 50 **[0010]** En la invención es importante que el antígeno polisacárido y el portador proteico no estén conjugados covalentemente entre sí. Esto tiene la gran ventaja de permitir la coformulación de muchos ingredientes especialmente antígenos diferentes para formar una composición de antígeno multivalente y evitar el paso de conjugación química que sería necesario para tal conjugación.
- 55 **[0011]** El portador proteico es no tóxico para un cuerpo mamífero y no debe estimular una respuesta inmune innata cuando es administrado al mismo. Por lo tanto, el portador es efectivamente "inerte" en el cuerpo mamífero. Esto es en contraste con los adyuvantes proteicos que no son biológicamente inertes pero enlazan (ya sea ellos mismos directamente, o por componentes que liberan de las células huésped muertas) receptores huésped para provocar respuestas celulares de las células del sistema inmunológico en forma de una respuesta inmune innata.
- 60
- 65

- 5 [0012] La proteína portadora tiene un peso molecular lo suficiente alto para actuar como un antígeno células-T dependiente. El peso molecular es al menos 35 kDa, por ejemplo de hasta 1000 kDa, por ejemplo en el intervalo de 75-400 kDa. La proteína es seleccionada del toxoide tetánico y del toxoide diftérico. La proteína debe ser generalmente no hemolítica, y no tóxica. En términos de no-toxicidad, por ejemplo, la proteína debe tener un LD50 en exceso de 4 mg/kg (en ratones, iv o sc). Preferiblemente la proteína debe ser nivel 6 en la escala Hodge & Sterner, es decir ser Relativamente Inofensiva.
- 10 [0013] Las proteínas adecuadas incluyen el toxoide tetánico, el toxoide diftérico y la difteria CRM197 (una mutación genética de la toxina de la difteria). El toxoide tetánico tiene un peso molecular de alrededor de 100 kDa. El toxoide tetánico y la difteria CRM197 (una mutación genética de la toxina) fallan al provocar la respuesta inmune significativa provocada por las toxinas correspondientes. Se piensa que esto es debido a la atenuación por el formaldehído o por la mutación genética. Estos portadores, sin embargo, provocan una respuesta inmune adaptativa por activación y la posterior proliferación de células T colaboradoras que son necesarias para las respuestas de anticuerpos.
- 15 [0014] Preferiblemente, la composición liposómica es una forma de dosificación unitaria y comprende 1-30 µg del portador proteico, más preferiblemente 10-30 µg. Se cree que tales dosificaciones son adecuadas para la administración a un sujeto en necesidad de inmunización, como un humano.
- 20 [0015] En la invención, el antígeno polisacárido está preferiblemente derivado de un agente infeccioso, preferiblemente una bacteria patógena, por ejemplo seleccionada de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *E. coli*, o *Streptococcus* del grupo B. Más preferiblemente el antígeno está derivado del *Haemophilus influenzae* o del *Streptococcus pneumoniae*. El antígeno polisacárido es preferiblemente un antígeno independiente de las células T. En la composición de la invención, la proporción de peso del antígeno polisacárido con el portador proteico está preferiblemente en el intervalo 6:1 a 1:6, más preferiblemente 4:1 a 1:3. Preferiblemente hay un exceso de polisacárido a proteína en la composición.
- 25 [0016] En la invención, puede haber un único antígeno polisacárido pero preferiblemente la composición es multivalente, es decir comprende varios antígenos polisacáridos en una mezcla. La composición puede comprender dos o más, tres o más, cinco o más, siete o más, por ejemplo hasta 40, preferiblemente en el intervalo de 7 a 23 antígenos polisacáridos. Preferiblemente, los antígenos están derivados de las mismas especies de bacteria. Los antígenos en tal composición multivalente pueden estar co-encapsulados en liposomas, o puede haber varias poblaciones, los liposomas de los cuales contienen cada uno un antígeno separado o mezcla de antígenos distinta al de otras poblaciones. Preferiblemente los antígenos están atrapados separadamente en liposomas, que hay una población de zona para cada antígeno polisacárido. Esto permite una óptima flexibilidad en términos de generar una variedad de vacunas de los mismos diferentes de materiales de partida comunes.
- 30 [0017] Los liposomas comprenden compuestos que no tienen una carga iónica total. Los compuestos son preferiblemente neutros, incluyendo compuestos bipolares con una carga aniónica y una catiónica, pero pueden contener cantidades pequeñas de compuestos aniónicos o catiónicos siempre que estos tengan la carga equilibrada con compuestos cargados opuestamente. Preferiblemente los compuestos comprenden compuestos de fosfatidilcolina y/o compuestos de fosfatidiletanolamina. Los compuestos que forman los liposomas son habitualmente anfífilicos, es decir consisten de un componente hidrofóbico y de un componente hidrofílico. Los componentes hidrofóbicos son generalmente proporcionados por cadenas de acilo pero los compuestos que forman los liposomas pueden alternativamente ser compuestos lípidos basados en glicerol-éter. Los compuestos no lípidos, esto es los no basados en compuestos de glicerol, pueden ser incluidos si se desea, por ejemplo materiales de tipo surfactante no iónicos. Preferiblemente las composiciones comprenden colesterol, por ejemplo en una cantidad molar de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 25%, en base a los componentes que forman los liposomas totales.
- 35 [0018] La composición de la invención puede estar en forma de una suspensión acuosa, que es en la que los liposomas están suspendidos en un medio acuoso continuo. Alternativamente la composición puede ser un precursor de tal composición acuoso, que puede estar diluida con agua o un líquido acuoso para formar la suspensión acuosa. Tales precursores pueden estar en la forma de materiales secos, especialmente en forma de polvo, por ejemplo proporcionados por secado por aspersión o secado por congelación (liofilización).
- 40 [0019] Las composiciones de la invención pueden además comprender (un) diluyente(s) y/o excipientes. Ya que se pretende que las composiciones sean usadas directamente o después de pasos de formulación intermedios, por ejemplo dilución, para ser administrados a sujetos mamíferos, los diluyentes o los excipientes don preferiblemente farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados son conocidos.
- 45 [0020] Se prefiere particularmente que la composición comprenda azúcares. Los azúcares pueden ayudar a la estabilización de los liposomas durante la formación de los liposomas y/o en el almacenamiento. Preferiblemente los liposomas están formados por el método de deshidratación-rehidratación, vesículas unilamelares pequeñas vacías (SUV) (por ejemplo hechas por hidratación de película lipida seca para formar vesículas multi-lamelares (MLV) y sonicación a SUV) y activas (antígeno polisacárido y portador proteico) están suspendidas es un líquido acuoso antes del secado preferiblemente por liofilización. El producto seco es después rehidratado y opcionalmente sujeto a
- 50
- 55
- 60
- 65

pasos para remover el material no-atrapado, los liposomas de gran tamaño o para reducir el tamaño de liposoma medio, por métodos conocidos por personas expertas en la materia.

5 **[0021]** Para un control mejorado del tamaño de la vesícula rehidratada, el método usado incluye azúcar en el líquido suspendido del paso de deshidratación, como se estudia en la WO99/65465. El azúcar puede ser seleccionado de monosacáridos como la glucosa y la fructosa, disacáridos como la lactosa y la sacarosa así como de polisacáridos. Un azúcar particularmente preferido es un disacárido como la trehalosa, la sacarosa o la lactosa o un monosacárido como la glucosa. En particular el azúcar preferido es la sacarosa.

10 **[0022]** En tales métodos, la cantidad de azúcar es tal que la proporción de masa de azúcar al liposoma que forma el compuesto está en el intervalo de 1:1 a 6:1 w/w, más preferiblemente de 1:1 a 5:1. Con niveles más altos de azúcar, la eficiencia de la encapsulación del método se reduce. Con cantidades más bajas de azúcar, sin embargo, se pierde el control sobre el tamaño de los liposomas finales.

15 **[0023]** La invención además proporciona un proceso para el proceso de producción de la nueva composición en el que el antígeno polisacárido y el portador proteico están co-encapsulados en liposomas, como se define en la reivindicación 31.

20 **[0024]** Preferiblemente los métodos descritos anteriormente son usados para la encapsulación. No se necesita usar azúcar pero preferiblemente es usada en estos métodos de deshidratación-rehidratación. Los liposomas vacíos son preferiblemente de tamaño pequeño o medio y pueden ser multilamelares o unilamelares.

25 **[0025]** Los liposomas del producto tienen un diámetro medio en el intervalo de 50 a 700 nm, preferiblemente en el intervalo de 80 a 500 nm, más preferiblemente en el intervalo de 80 a 300 nm. Preferiblemente la composición contiene niveles muy bajos de liposomas con diámetros mayores de 1500 nm, incluso más preferiblemente niveles muy bajos de liposomas con diámetros mayores de 1000 nm. El nivel de liposomas muy pequeños, por ejemplo menos de 20 nm debe ser mantenido también lo más bajo posible. Los tamaños son medidos por espectroscopia de correlación de fotones.

30 **[0026]** La invención también proporciona el uso de liposomas y composiciones en la fabricación de un medicamento para la administración a un mamífero para provocar una respuesta inmune al antígeno polisacárido.

35 **[0027]** Preferiblemente la respuesta inmune implica la producción de IgC al menos, al antígeno polisacárido, y adicionalmente preferiblemente IgM y IgA, preferiblemente de modo que se consiga en el recipiente un efecto protector a un desafío del microorganismo infeccioso.

40 **[0028]** Preferiblemente la composición se administra por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intranasal, por inhalación, por vía vaginal, vocalmente u oralmente. Más preferiblemente la composición es administrada por vía subcutánea.

45 **[0029]** Generalmente la administración es para propósitos protectores para proporcionar una respuesta contra la infección por un microbio infeccioso, especialmente una bacteria infecciosa, del tipo mencionado anteriormente. El sujeto al que se administra la composición puede ser un mamífero de cualquier edad, con necesidad de tener inmunidad protectora. La invención es de más valor para tratar humanos. Por ejemplo la administración puede ser para proporcionar resistencia a brotes estacionales, brotes específicos de las infecciones, o puede ser parte de programas de salud especialmente para niños. La invención es de valor particular para el tratamiento de niños humanos que tienen respuestas inmunes reducidas a antígenos independientes de las células-T, por ejemplo antígenos polisacáridos, por ejemplo siendo menores de la edad de dos años. La invención además proporciona métodos para administrar las composiciones. Realizaciones preferidas adicionales de la invención se mencionan en las reivindicaciones

50 **[0030]** Los siguientes ejemplos ilustran la invención y se refieren a las siguientes figuras, en las que

55 La Figura 1 muestra la respuesta de anticuerpos Anti PS (PRP) de ratones cuando se administran las formulaciones ID1, ID2 & 3 y Act-Hib sin colesterol (ejemplo 1);
La Figura 2 muestra la respuesta de anticuerpos Anti PS (PRP) de ratones cuando se administran las formulaciones ID4, ID1 y ACT-Hib con colesterol (ejemplo 1); y
La Figura 3 muestra la respuesta de anticuerpos IgG antes y después de la inmunización a siete serotipos probados (Ejemplo 2).

60 **Ejemplo 1**

[0031] Demostración de la respuesta anti polisacárida, en ratones, a las vacunas polisacáridas liposómicas en comparación a una administración de vacuna polisacárida autorizada (en hombres) de polisacárido.

Detalles experimentales:

5 [0032] Las siguientes formulaciones liposómicas (ID 1-6) fueron preparadas, Tabla 1, usando un secado / hidratación de película lipídica convencional a MLV/sonicación a vesículas unilamelares pequeñas proceso (SUV)/DRV (WO9965465). Se añadió masa lipídica de sacarosa x3 al SUV y material(es) para ser atrapados en la etapa SUV antes del proceso DRV para reducir el tamaño de los liposomas resultantes formados tras la etapa DRV. El diámetro medio del DRV por espectroscopia de correlación de fotones es de alrededor de 500 nm.

Tabla 1 Formulaciones liposómicas preparadas (ID 1-6)

Composición lipídica (proporción molar)	Materiales atrapados (^a = coa atrapados)		
	Toxoide Tetánico y PS (Hib PRP) ^a	Toxoide Tetánico	PS (Hib PRP)
EPC :DOPE :DOTAP (4:2:1)	ID1	ID2	ID3
Pc de Soja : Colesterol (11:9)	ID4	ND	ND

10 Detalles materiales: Los materiales lipídicos PC de Huevo (EPC, 98% de pureza, Lipoide) y PC de Soja Hidrogenada (SPC-3, 98% de pureza, Lipoide) fueron obtenidos de Lipoid GmbH. Mientras que la dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) (Número de Producto Avanti; 850725) fue obtenida de Avanti® Polar Lipids y, el propano 1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamonio (DOTAP) fue obtenido de Merck Chemicals Ltd. El polisacárido capsular de fosfato de ribitol de polirribosa purificado (PRP-PS) de *Haemophilus influenzae* tipo b y el material de Toxoide Tetánico fueron obtenidos del Serum Institute of India (SII), las eficacias de atrapamiento fueron probadas para el PS y la proteína para el ID1 y 4. Para ambos materiales para ID1 los valores estuvieron alrededor del 90%. Para ambos materiales para valores ID4 los valores fueron del alrededor del 70%.

15 [0033] Se probó para los EPC sin formulaciones de colesterol en la Tabla 1 su capacidad para inducir una respuesta de anticuerpos al antígeno polisacárido en ratones. A los ratones (CD-1), se les administró una dosis una vez por vía subcutánea con a) la formulación ID1 o b) con las formulaciones ID2 y 3, mezcladas inmediatamente antes de la dosificación. Se usó un producto de vacuna autorizado para la inducción de niveles protectores de anticuerpos anti PRP (PS) en humanos Act-Hib® (una vacuna de polisacárido capsular de fosfato de ribitol de polirribosa purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b, enlazado covalentemente a la proteína toxoide tetánica) como un control positivo comprador. Todas las dosis fueron normalizadas respecto a las dosis de PRP (PS) y TT administradas, 2 y 4 µg respectivamente.

25 [0034] Los resultados de muestran en la Figura 1.

Comentarios

30 [0035] Los resultados de los anticuerpos anti PS (PRP) generaron la siguiente inmunización con a) ID1, b) ID2 & 3 y, el Act-Hib® claramente indicó que:

35 a) Los TT y PS (PRP) co-administrados con la misma formulación de vehículo liposómico (ID1) producen una respuesta de anticuerpos más alta que la misma dosis de materiales TT y PS (PRP) pero administrada en vehículos liposómicos separados (ID2 y 3 respectivamente); y

b) Los TT y PS (PRP) co-administrados con la misma formulación de vehículo liposómico (ID1) producen una respuesta de anticuerpos más alta que la misma dosis de materiales TT y PS (PRP) administrada en la forma de una vacuna conjugada polisacárida proteica (act-Hib®).

40 [0036] Se probó la capacidad del PC de Soja con formulaciones de Colesterol de la Tabla 1 de inducir una respuesta de anticuerpos al antígeno polisacárido en ratones. A los ratones (CD-1), se les administró una dosis por vía subcutánea con a) la formulación ID4 o b) la formulación ID1, mezcladas inmediatamente antes de la dosificación. Se usó un producto de vacuna autorizado para la inducción de niveles protectores de anticuerpos anti PRP (PS) en humanos Act-Hib® (una vacuna de polisacárido capsular de fosfato de ribitol de polirribosa purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b, enlazado covalentemente a la proteína toxoide tetánica) como un control positivo comprador. Todas las dosis fueron normalizadas respecto a las dosis de PRP (PS) y TT administradas, 2 y 4 µg respectivamente.

45 [0037] Los resultados de muestran en la Figura 2.

Comentarios.

[0038] Los resultados de los anticuerpos anti PS (PRP) generaron la siguiente inmunización con a) ID4, b) ID1 y, el Act-Hib® claramente indicó que:

5 a) Los TT y PS (PRP) co-administrados con la misma formulación de vehículo liposómico (ID3) (con colesterol) producen una respuesta de anticuerpos más alta que la misma dosis de materiales TT y PS (PRP) administrada en la forma de una vacuna conjugada polisacárida proteica (act-Hib®).

10 b) Los TT y PS (PRP) co-administrados con la misma formulación de vehículo liposómico (ID4) (con colesterol) producen una respuesta de anticuerpos más alta que la misma dosis de materiales TT y PS (PRP) administrada en una formulación liposómica (ID1) sin colesterol.

Ejemplo 2

15 **[0039]** Demostración de respuestas IgG del suero polisacárido anti *Streptococcus pneumoniae* multivalente, en ratones, tras la inmunización de una mezcla (multivalente) de composiciones liposómicas monoserotipo que comprende polisacárido neumocócico co atrapado y toxina diftérica proteica (197) Mutante CRM sin liposomas.

Detalles experimentales:

20 **[0040]** Se prepararon las siguientes formulaciones liposómicas (ID7-20), Tabla 2, usando un secado/hidratación de película lípida convencional a MLV/sonicación al proceso SUV/DRV (es decir como en le ejemplo 1). Se añadió masa lípida de sacarosa x3 al SUV y material(es) para ser atrapados en la etapa SUV antes del proceso DRV para reducir el tamaño de los liposomas resultantes formados tras la etapa DRV.

25 **[0041]** Cada formulación (ID7-20), consistía de un serotipo polisacárido neumocócico co atrapado con la toxina diftérica proteica CRM 197 mutante dentro de liposomas. La forma mutante de la toxina diftérica es descrita y fue aislada como en Uchida, Jr., T., Pappenheimer, Jr., A.M, Greany, R., (1973) J. Biol. Chem. 248, 3838-3844. Y Uchida Jr., T.; Pappenheimer, Jr., A.M., Harper, A.A., (1973) J. Biol. Chem. B 248-3845-3850. La CRM197 es un mutante DT no tóxico que contiene una lesión en la cadena A bloqueando la ribosilación ADP. La CRM resulta de un cambio base en el gen estructural resultando en la sustitución del ácido glutámico por glicina. Mientras la CRM no muestra actividad enzimática, es inmunológicamente idéntica a la toxina diftérica (Pappenheimer, Jr., A.M, Uchida, T. y Harper, A.A. (1972) Immunochem. 9, 891-906).

35 **[0042]** La CRM197 es similar al toxoide diftérico. La CRM197 es una proteína bien definida en contraste con la toxina tratada con formaldehído (toxóide) que no-estada reticulada específicamente. . En geles SDS, la proteína CRM197 migra como un único gran grupo de aproximadamente un peso molecular de 63.000 daltons.

Tabla 2 Formulaciones atrapadas mono PS liposómicas preparadas (ID7-20)

ID de la Formulación	Lípido(SUV), mg	Toxina Diftérica CRM197, µg	Polisacárido Neumocócico	
			µg	(Serotipo)
ID7	7.81	21	84	1
ID8	7.81	21	84	2
ID9	7.81	21	84	4
ID10	7.81	21	84	5
ID11	7.81	21	84	6B
ID12	7.81	21	84	7F
ID13	7.81	21	84	9N
ID14	7.81	21	84	9V
ID15	7.81	21	84	12F
ID16	7.81	21	84	14
ID17	7.81	21	84	15B
ID18	7.81	21	84	19F
ID19	7.81	21	84	23F
ID20	7.81	21	84	33F

Detalles materiales: los materiales lipídicos usados fueron PC de Huevo (EPC, 98% de pureza, Lipoide) y colesterol (Sigma). Se obtuvieron polisacárido capsular neumocócico (Pn PS) equivalente a los materiales de American Type Culture Collection (ATCC) y la proteína CRM197 de toxina diftérica del Serum Institute of India Limited (SIIL).

[0043] Las formulaciones atrapadas mono PS liposómicas (ID7-20) fueron individualmente rehidratadas (proceso DRV) y reunidas juntas para hacer una formulación multivalente inmediatamente antes de la inmunización, por inyección subcutánea, de cinco ratones CD1 (femeninos). La dosis de la vacuna multivalente contiene el equivalente de 14 formulaciones monovalentes que contienen 6 µg de polisacárido neumocócico y 1,5µg de proteína CRM197 de toxina diftérica y 0,559 mg de lípidos. Consecuentemente, la vacuna multivalente (14 serotipos) administrada a los ratones contiene un total de 84 µg de polisacárido neumocócico y 21 µg de proteína CRM197 de toxina diftérica y 7,81 mg de lípidos.

[0044] Los ratones recibieron un total de dos dosis de inmunización con 21 días de diferencia, adicionalmente se tomaron de los ratones muestras de sueros por muestreo de la vena de la cola superficial antes de la primera dosis de inmunización y 14 días tras la segunda dosis.

[0045] Las muestras de suero de ratón obtenidas fueron analizadas para algunos anticuerpos de *Streptococcus pneumoniae*, IgG (7Serotipos:- 4, 6B, 9V, 14,18C (detecta respuestas 33F), 19F y 23F), por detección fluorescente multianalito (Luminex). Este trabajo fue realizado en el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Para los otros serotipos no había disponible ningún kit y por lo tanto las respuestas no fueron medidas.

[0046] La detección fluorescente multianalito Luminex está basada en cuentas microscópicas (microesferas) etiquetadas internamente con dos fluoróforos independientes. Cuando se excitan por un láser de 635 nm, los fluoróforos emiten unas longitudes de onda distintas, 658 nm y 712 nm. Variando las tasas de emisión 658/712, se puede crear una serie de hasta 100 perfiles fluorescentes diferentes, llamados clasificaciones. Usando fluidos de precisión, procesadores de señal digital, y ópticas avanzadas, el analizador Luminex 100 asigna cada microesfera de acuerdo a una clasificación predeterminada. Por lo tanto, las clasificaciones de múltiples cuentas pueden ser combinadas en una única muestra. En el análisis empleado cada serotipo de polisacárido neumocócico individual está unido covalentemente a una microesfera con una clasificación única. Durante el proceso de análisis, todas las microesferas de serotipo de polisacárido neumocócico diferentes están combinadas con una única dilución de muestra de murino de prueba. Los anticuerpos en la muestra de murino se unen a los antígenos polisacáridos neumocócicos en las microesferas. La cantidad de anticuerpo enlazado a las microesferas es determinado con IgG anti-ratón conjugado con ficoeritrina. Cuando se excita a 532 nm, la ficoeritrina emite a 575 nm. La intensidad fluorescente a 575 nm es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo enlazado a las microesferas. Ya que la especificidad y posición del analito de cada clasificación de cuenta en la serie es conocida, una única molécula reportadora fluorescente puede ser usada para calcular los niveles de anticuerpo específicos para todos los serotipos probados (representados por las cuentas de polisacáridos conjugadas).

Resultados:

[0047] La Figura 3 muestra los anticuerpos de *streptococcus pneumoniae* calculados, la murina IgG (respuestas específicas de serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C (* ver Figura 3, detecta respuestas 33F), 19F y 23F), por detección fluorescente multianalito. Las barras representan la respuesta media de 5 ratones a los que se les administró una dosis y las barras de error son desviaciones estándar, las barras vacías son la respuesta antecedente pre inmunización de los ratones mientras que la barra sólida es la respuesta siguiente al programa de inmunización.

Comentarios

[0048] La respuesta media a los siete serotipos probados fue desarrollada siguiendo a la inmunización con la mezcla (multivalente) de composiciones liposómicas monoserotipo comprendidas de polisacáridos neumocócicos coatrapados y la toxina diftérica proteica (197) CRM mutante dentro de liposomas. El aumento en la respuesta, tras la inmunización, en relación con la respuesta pre inmunización, fue 1,8, 6,3, 1,4, 1,5, 2,5, 5,3 y 3,6 veces para los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 33F, 19F y 23F respectivamente.

[0049] Así la composición descrita demuestra la capacidad de causar una respuesta de anticuerpos a los antígenos polisacáridos neumocócicos multivalentes en los ratones tras la inmunización con una mezcla (multivalente) de composiciones liposómicas monoserotipo que comprenden polisacárido neumocócico y toxina diftérica proteica (197) CRM mutante dentro de los liposomas.

Ejemplo 3

[0050] Demostración de la Eficacia Protectora a *Streptococcus pneumoniae* (desafío) vivo en ratones, tras la inmunización de una mezcla (multivalente) de composiciones liposómicas monoserotipo que comprenden polisacárido neumocócico coatrapado y Toxina Diftérica proteica (197) CRM Mutante dentro de los liposomas con un refuerzo de vacuna (Pneumovax) polisacárida neumocócica.

Detalles experimentales:

5 **[0051]** Se prepararon las siguientes formulaciones liposómicas (ID21-34), Tabla 3, usando un secado / hidratación de película lípida convencional a MLV/sonicación al proceso SUV/DRV (como en el Ejemplo 1). Se añadió masa lípida de sacarosa x3 al SUV y material(es) para ser atrapados en la etapa SUV antes del proceso DRV para reducir el tamaño de los liposomas resultantes formados tras la etapa DRV.

[0052] Cada formulación (ID21-34), consistía de un serotipo polisacárido neumocócico individual coatrapado con una Toxina Diftérica proteica CRM197 mutante dentro de liposomas

Tabla 3 Formulaciones atrapadas mono PS liposómicas preparadas (ID21-34)

ID de la Formulaci3n	Lípido(SUV), mg	Toxina Diftérica CRM197, µg	Polisacárido Neumocócico	
			µg	(Serotipo)
ID21	16.6	158.4	66	1
ID22	16.6	158.4	66	2
ID23	16.6	158.4	66	4
ID24	16.6	158.4	66	5
ID25	16.6	158.4	66	6B
ID26	16.6	158.4	66	7F
ID27	16.6	158.4	66	9N
ID28	16.6	158.4	66	9V
ID29	16.6	158.4	66	12F
ID30	16.6	158.4	66	14
ID31	16.6	158.4	66	15B
ID32	16.6	158.4	66	19F
ID33	16.6	158.4	66	23F
ID34	16.6	158.4	66	33F

Detalles materiales:

10 **[0053]** Los materiales lípidicos usados fueron PC de huevo (E PC, 98 % de pureza, Lipoide) y Colesterol (Sigma). Se obtuvieron polisacárido capsular neumocócico (Pn PS) equivalente a los materiales de American Type Culture Collection (ATCC) y la proteína CRM197 de toxina diftérica del Serum Institute of India Limited (SIIL).

15 **[0054]** Las formulaciones atrapadas mono PS liposómicas (ID21-34) fueron individualmente rehidratadas (proceso DRV) y reunidas juntas para hacer una formulación multivalente inmediatamente para la inmunización, por inyección subcutánea, de diez ratones Balb/C (femeninos). La dosis de la vacuna multivalente contenía el equivalente de 14 formulaciones monovalentes que contienen 0,2 µg de polisacárido neumocócico y 0,48µg de proteína CRM197 de toxina diftérica y 0,138 mg de lípidos. Consecuentemente, la vacuna multivalente (14 serotipos) administrada a los
20 ratones contiene un total de 2,8 µg de polisacárido neumocócico y 6,72 µg de proteína CRM197 de toxina diftérica y 1,935 mg de lípidos.

[0055] Se inmunizaron des grupos de ratones:

25 **[0056]** El Grupo 1 fue inmunizado, 14 días de intervalo entre las dosis, con 3 dosis de la mezcla (multivalente) de composiciones liposómicas monoserotipo, seguido por el refuerzo de vacuna polisacárida neumocócica (Pneumovax) administrada 8 semanas tras la última dosis de formulación liposómica.

30 **[0057]** La dosis de Pneumovax administrada consiste de una mezcla de polisacáridos capsulares altamente purificados de 23 tipos neumocócicos de *Streptococcus pneumoniae*, serotipos (1 2 3 4 5 6B 7F 8 9N 9V 12A 11A 12F 14 15B 17F 18C 19F 19A 20 22F 23F y 33F). El nivel de dosis administrada para cada serotipo polisacárido

capsular purificado fue de 7,5 µg y consecuentemente la dosis de polisacárido total administrada de Pneumovax fue de 172,5 µg.

5 [0058] El Grupo 2 fue inmunizado, 14 días de intervalo entre las dosis, con 3 dosis de vacuna polisacárida neumocócica (Pneumovax), seguido por el refuerzo de vacuna polisacárida neumocócica (Pneumovax) administrada 8 semanas tras la tercera dosis de Pneumovax.

10 [0059] El desafío de *Streptococcus pneumoniae* vivo, fue realizado en todos los ratones cuatro semanas después de la última dosis. Brevemente, los ratones fueron desafiados por vía intraperitoneal con 0,5 ml de suspensión de *S. pneumoniae* (serotipo 6B) preparada de colonias sobrepotenciadas frescas de un 5% de una placa de agar de sangre de caballo fueron suspendidas en caldo de carne de vaca y además diluidas a $4,0 \times 10^7$ CFU/ml.

15 [0060] Los ratones fueron observados durante 6 días tras la administración del desafío bacteriano, y se les puntuó de 0-4 en base a su comportamiento y signos clínicos como sigue.

Puntuación 0: saludable

Puntuación 1: señales clínicas menores de infección e inflamación, por ejemplo observaciones de señales menores de aflicción y dolor, actividad cambiada, y aislamiento social.

20 Puntuación 2: signos severos de infección como movimientos rígidos, falta de curiosidad, ventilación forzada, posición del cuerpo cambiada, piloerección en la piel, o cambios en el movimiento.

Puntuación 3: dolor severo y el ratón fue sacrificado inmediatamente para minimizar el sufrimiento del animal.

25 Puntuación 4: el ratón estaba muerto

Resultados:

[0061] Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5, de respuestas observadas en los ratones siguiendo el desafío de *Streptococcus pneumoniae* vivo

Tabla 4 – Grupo 1

	Día 0	Día 1		Día 2		Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Supervivencia
ratón no.	pm	am	pm	am	pm	am	am	am	am	
1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	56%
2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
3	1	4								
4	1	4								
5	1	4								
6	0	1	2	1	1	2	1	1	1	
7	Muerto antes del desafío									
8	0	1	2	0	0	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	2	3							

Tabla 5 – Grupo 2

ratón no.	Día 0	Día 1		Día 2		Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Supervivencia
	pm	am	pm	am	pm	am	am	am	am	
1	0	0	0	1	2	3				11%
2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
3	1	3								
4	0	3								
5	Muerto antes del desafío									
6	2	3								
7	2	4								
8	1	1	1	4						
9	2	4								
10	2	4								

Comentarios:

5 **[0062]** Los resultados demuestran que los ratones están mejor protegidos contra el desafío de *Streptococcus pneumoniae* vivo (serotipo 6B), tras la inmunización de una mezcla (multivalente) de composiciones liposómicas monoserotipo que constan de polisacárido neumocócico coatrado y Toxina Diftérica proteica (197) CRM Mutante dentro de los liposomas con un refuerzo de vacuna polisacárida neumocócica (Pneumovax) en comparación con la inmunización con sólo la vacuna polisacárida neumocócica (Pneumovax).

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición liposómica que comprende co atrapados en el espacio intravesicular de liposomas un antígeno polisacárido y un portador proteico.
- Donde el antígeno polisacárido es soluble en agua y el portador proteico tiene al menos un epítipo de células T, un peso molecular de al menos 35 kDa, es no tóxico y es seleccionado del toxoide tetánico y el toxoide diftérico;
- 10 Donde el antígeno polisacárido y el portador proteico están no conjugados; y los liposomas tienen un diámetro medio en el intervalo de 50-700 nm y están formados de liposomas que forman compuestos que no tienen, en combinación, carga iónica total y comprenden al menos un fosfolípido.
- 15 **2.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 1, en la que los liposomas que forman compuestos comprenden colesterol preferiblemente en una cantidad de al menos el 25% por mol en base a los liposomas totales que forman compuestos.
- 3.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que los liposomas que forman compuestos incluyen al menos un compuesto cargado catiónicamente.
- 20 **4.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina opcionalmente en combinación con fosfatidiletanolamina.
- 5.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los liposomas tienen un diámetro medio en el intervalo de 80/500 nm.
- 25 **6.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proporción de antígeno polisacárido a portador proteico está en el intervalo 6:1 a 1:6.
- 30 **7.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 6, donde la proporción de la proporción de antígeno polisacárido a portador proteico está en el intervalo 4:1 a 1:3.
- 8.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma de dosificación unitaria.
- 35 **9.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 8, en la que cada dosificación unitaria comprende 1-30 µg de portador proteico.
- 10.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el antígeno polisacárido no tiene carga iónica total.
- 40 **11.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno polisacárido es un antígeno independiente de las células T.
- 12.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 11, en la que el antígeno polisacárido está derivado de un agente infeccioso preferiblemente una bacteria patógena, preferiblemente *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mesisseria meningitidis*, *E. coli*, o *Streptococcus* del grupo B.
- 45 **13.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 11 o a la reivindicación 12, que comprende varios de tales antígenos polisacáridos.
- 50 **14.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 13, en la que los antígenos están derivados de la misma especie de bacteriana.
- 15.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en la que cada antígeno está encapsulado en una población separada de liposomas.
- 55 **16.** Una composición de acuerdo a la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en la que varios antígenos están encapsulados en los mismos liposomas de la población.
- 60 **17.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es acuosa y en la que los liposomas están suspendidos en un medio acuoso continuo.
- 18.** Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que está en forma seca, preferiblemente en forma de polvo, preferiblemente en forma de polvo liofilizado.
- 65

19. Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo adicionalmente uno o más azúcares.
- 5 20. Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una composición farmacéutica y comprende un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
21. El uso de liposomas como se define en la reivindicación 1, en la fabricación de una composición para la administración a un mamífero para provocar una respuesta inmune al antígeno polisacárido.
- 10 22. El uso de acuerdo a la reivindicación 21, en la que la respuesta inmune implica la producción de IgG, IgM o IgA, preferiblemente IgA, específica para el antígeno polisacárido.
- 15 23. El uso de acuerdo a la reivindicación 21 o la reivindicación 22, en el que la composición es administrada por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intranasal, por inhalación, por vía vaginal, bucalmente u oralmente.
24. El uso de acuerdo a la reivindicación 23, en la que la composición es administrada por vía subcutánea.
- 20 25. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 21-24, en donde la composición es administrada en una dosificación unitaria que comprende 1-30 µg de portador proteico.
26. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en el que la repuesta inmune es una respuesta protectora contra la infección por el microbio, preferiblemente bacteria, de la que se deriva el antígeno polisacárido.
- 25 27. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en la que el mamífero es un humano, preferiblemente un niño, más preferiblemente de menos de 2 años, por ejemplo menor de 6 meses.
28. Una composición de acuerdo a la reivindicación 20, para el uso en provocar una respuesta inmune en un animal, mediante la cual se provoca una respuesta inmune contra el antígeno polisacárido bacteriano.
- 30 29. Una composición de acuerdo a la reivindicación 28, en donde la dosificación unitaria de la composición comprende 1-30 µg de portador proteico.
- 35 30. Una composición de acuerdo a las reivindicaciones 28 a 29, en la que la respuesta inmune aumenta los anticuerpos IgG específicos para el antígeno polisacárido.
31. Un método para formar una composición liposómica de acuerdo a la reivindicación 1, comprendiendo
- 40 (i) mezclar liposomas vacíos formados de compuestos que forman liposomas que no tienen, en combinación, carga iónica total y comprenden al menos un fosfolípido con un antígeno polisacárido soluble en agua y un portador proteico que tiene al menos un epítipo de células T y un peso molecular de al menos 35 kDa seleccionado del toxoide tetánico y del toxoide diftérico, el antígeno polisacárido y el portador proteico estando no conjugados.
- 45 (ii) secar la mezcla del paso (i); y
- (iii) rehidratar la mezcla del paso (ii) para formar una suspensión de vesículas de deshidratación-rehidratación (DRV, que tienen un diámetro medio en el intervalo de 50 a 700 nm.
- 50 32. Un método de acuerdo a la reivindicación 31, en el que el material no atrapado es al menos parcialmente retirado de las DRVs.
33. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32, en donde en el paso (i), hay presente un azúcar en la mezcla de liposomas vacíos, proteínas y antígeno polisacárido.

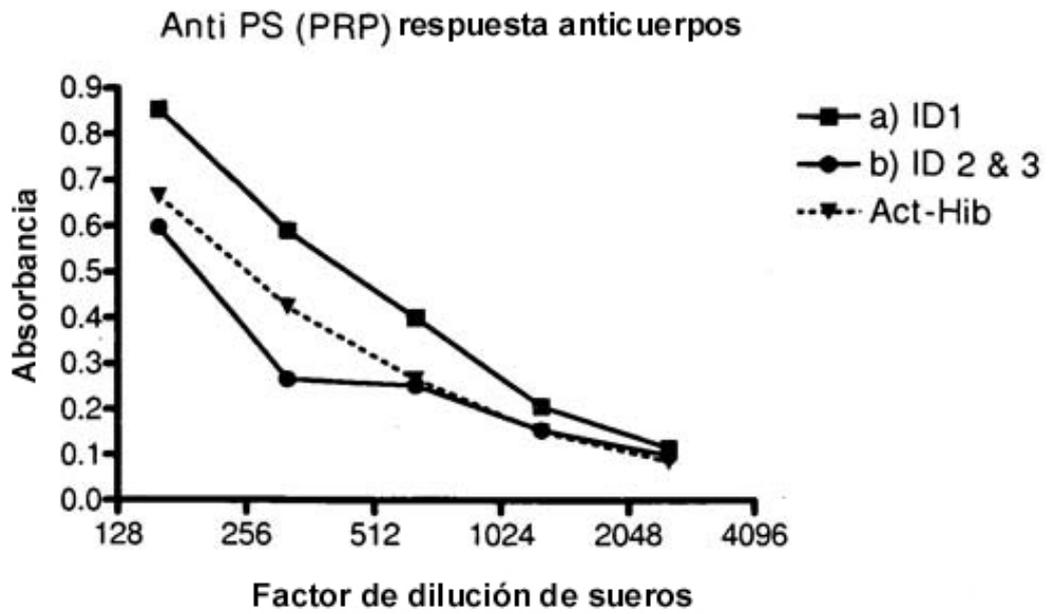


Fig. 1

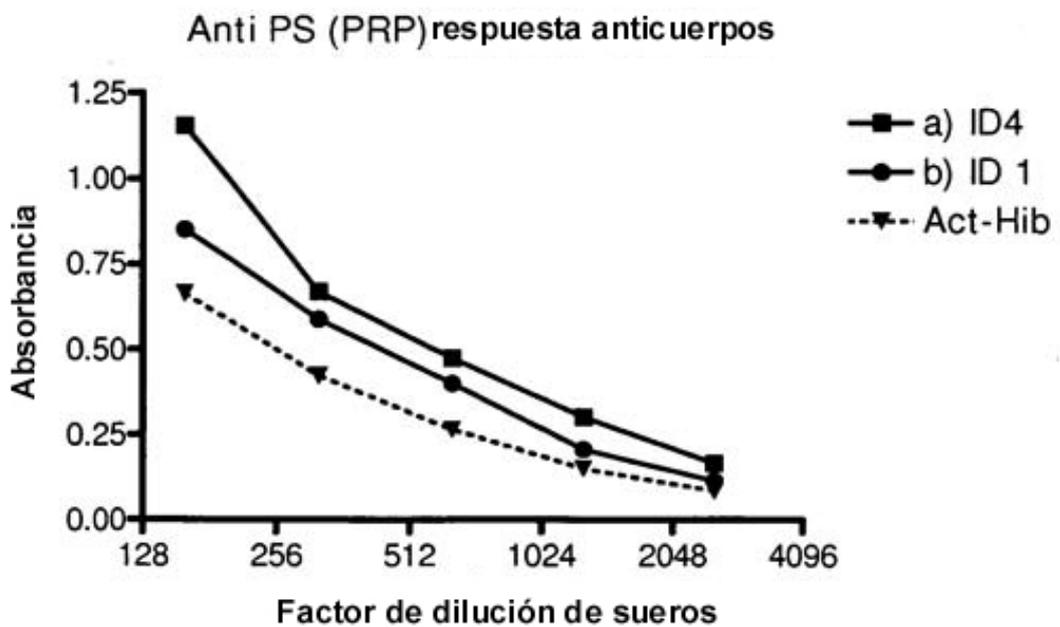


Fig. 2

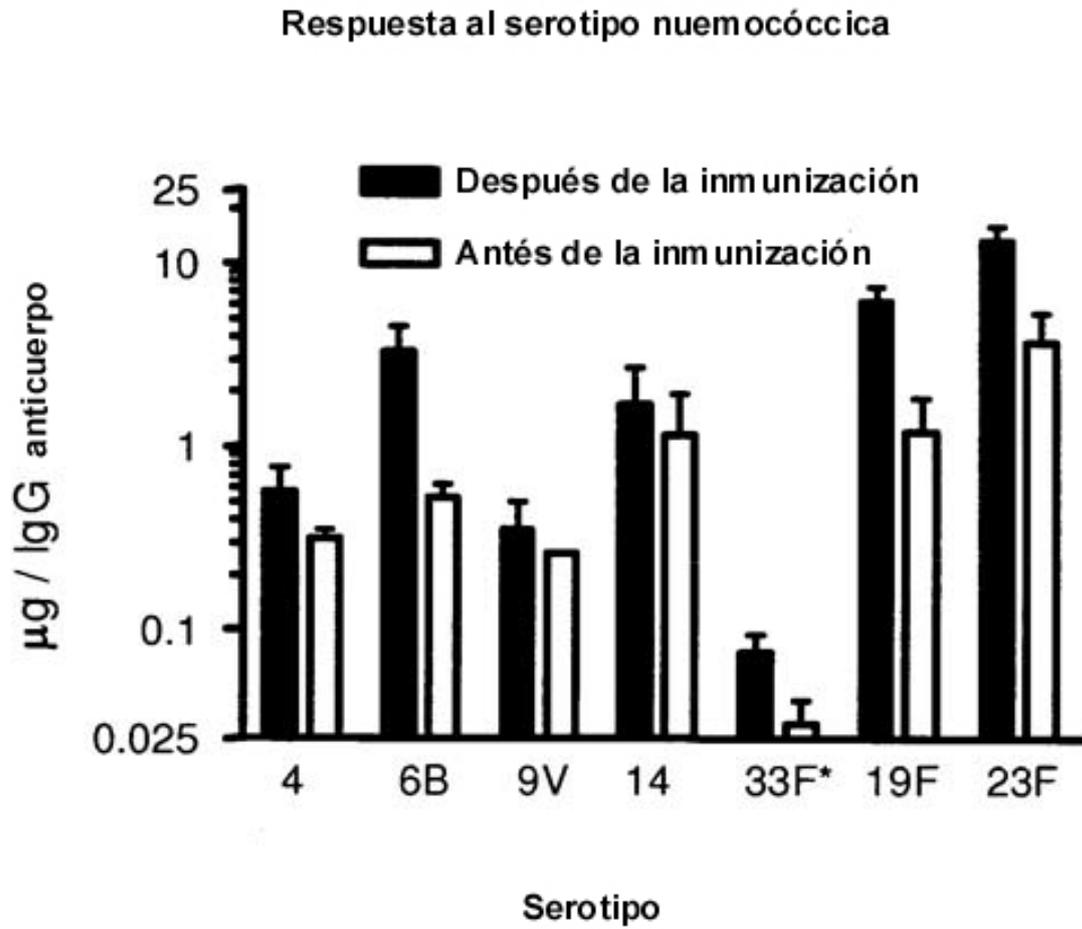


Fig. 3