

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 876**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/102** (2006.01)

**A61K 39/13** (2006.01)

**A61K 39/29** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61K 39/095** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2001 E 01984627 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1317280**

54 Título: **Vacuna contra Streptococcus pneumoniae**

30 Prioridad:

**15.09.2000 GB 0022742**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.09.2015**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)  
RUE DE L'INSTITUT 89  
1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

**HERMAND, PHILIPPE;  
LAFERRIERE, CRAIG ANTONY JOSEPH;  
LOBET, YVES y  
POOLMAN, JAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 545 876 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

Vacuna contra *Streptococcus pneumoniae*

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una combinación de 2 o más proteínas de *S. pneumoniae*, a su fabricación y a su uso en medicina como una vacuna. Dichas combinaciones son particularmente útiles para la protección de los infantes y personas de edad avanzada contra infección por estreptococos.

**Antecedentes de la invención**

10 *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva responsable de considerable morbilidad y la mortalidad (en particular en las personas jóvenes y mayores), que provocan enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteriemia y meningitis y las enfermedades asociadas con la colonización, tales como otitis media aguda. La tasa de neumonía neumocócica en los EE.UU. para personas mayores de 60 años de edad es de 3 a 8 por cada 100.000. En el 20 % de los casos esto da lugar a bacteriemia y a otras manifestaciones tales como meningitis, con un índice de mortalidad próximo al 30 % incluso con un tratamiento de antibióticos.

15 El neumococo se encapsula con un polisacárido unido químicamente que confiere especificidad de serotipo. Existen 90 serotipos conocidos de neumococos y la cápsula es el principal determinante de virulencia para neumococos, ya que la cápsula no solo protege del complemento a la superficie interna de las bacterias, sino que por sí misma es poco inmunógena. Los polisacáridos son antígenos T-independientes y no pueden procesarse o presentarse en moléculas MHC para interactuar con células T. Pueden sin embargo, estimular el sistema inmunitario a través de un mecanismo alternativo que implica reticulación de los receptores de la superficie en linfocitos B.

20 Se mostró en varios experimentos que la protección frente a enfermedad neumocócica invasiva se correlaciona lo más fuertemente con anticuerpo específico para la cápsula y la protección es específica de serotipo.

25 *Streptococcus pneumoniae* es la causa más común de enfermedad bacteriana invasiva y otitis media en infantes y niños pequeños. Asimismo, los pacientes de edad avanzada producen respuestas débiles a vacunas neumocócicas [Roghmann et al., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], de ello la incidencia incrementada de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

30 Una vacuna neumocócica no conjugada 23-valente ha mostrado una amplia variación en eficacia clínica, desde el 0 % hasta el 81 % (Fedson et al. (1994) Arch Intern Med. 154: 2531-2535). La eficacia parece estar relacionada con el grupo de riesgo que está inmunizándose, tal como las personas de edad avanzada, las personas con enfermedad de Hodgkin, esplenectomía, anemia falciforme y agammaglobulinemia (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 frente a las enfermedades de neumonía neumocócica (en determinados grupos de alto riesgo tales como las personas de edad avanzada) ni de otitis media.

35 Se conoce la inmunización de ratones con combinaciones de proteínas de virulencia neumocócicas proteínas (Ogunniyi et al., (2000), Infección y Immunity 68; 3028-3033). Las vacunas que comprenden proteínas de tríada de polihistidina se divulgan (documento WO00/37105).

Estrategias que se han diseñado para superar esta falta de inmunogenicidad en infantes, incluyen el enlace del polisacárido a proteínas inmunógenas grandes, que proporciona linfocitos T coadyuvantes presenciales y que induce memoria inmunológica contra el antígeno polisacárido al que se conjugan.

40 Sin embargo, aún existe la necesidad de una mejora en las composiciones de vacunas antineumocócicas, en particular en las que será más eficaz en la prevención o mejora de enfermedad neumocócica (particularmente neumonía) en personas de edad avanzada y en niños pequeños.

La presente invención proporciona una vacuna tal mejorada.

**Sumario de la invención**

45 En un aspecto, la presente invención es una composición inmunógena que comprende al menos 2 proteínas de *S. pneumoniae* según se definen en la reivindicación 1.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una vacuna para tratar o mejorar otitis medias en infantes o neumonía en personas de edad avanzada. Opcionalmente, la vacuna comprende adicionalmente un coadyuvante, que es preferentemente un inductor de una respuesta TH1.

50 En otro aspecto relacionado más, es un procedimiento para fabricar la vacuna de la invención seleccionando y aislando 2 proteínas diferentes de *S. pneumoniae* y mezclando ambas proteínas con un vehículo farmacéuticamente aceptable según se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Descripción de la invención**

La presente invención proporciona una vacuna mejorada para la prevención o mejora de infección neumocócica de los pacientes de edad avanzada (p. ej., neumonía) y/o en infantes (p. ej., otitis media), dependiendo de un enfoque basado en proteínas neumocócicas. En un modo de realización preferente, la vacuna es adecuada para la prevención o mejora de infección neumocócica de las personas de edad avanzada. Como la mayoría de los adultos han estado expuestos a *Streptococcus pneumoniae*, la presente vacuna es para reforzar la respuesta inmunitaria subyacente en adultos y pacientes de edad avanzada a niveles protectores por la administración de al menos 2 proteínas neumocócicas identificadas en la presente invención. Las proteínas neumocócicas se administran en ausencia de polisacáridos de *S. pneumoniae*.

En el contexto de la presente invención se considera persona de edad avanzada a un paciente si tiene 55 o más años de edad, típicamente si tiene más de 60 años y más generalmente si tiene más de 65 años. Por tanto en un modo de realización la invención proporciona una composición de vacuna que comprende proteínas neumocócicas para la prevención de la neumonía en pacientes de edad avanzada.

En otro modo de realización, la presente invención proporciona una composición de vacuna, adecuada para su uso en infantes (típicamente de 0 a 2 años), que comprende dos o más proteínas neumocócicas identificadas en la presente invención.

Proteínas neumocócicas de la divulgación

Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la divulgación bien están expuestas en superficie, al menos durante parte del ciclo de vida del neumococo, o bien son proteínas que se secretan o se liberan por el neumococo. Preferentemente la combinación de proteínas de la divulgación se seleccionan de entre 2 categorías diferentes tales como las proteínas que tienen un motivo de secuencia señal de tipo II de LXXC (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia tríada de polihistidina (PhtX)), las proteínas de unión a colina (CbpX), las proteínas que tienen un motivo de secuencia señal de tipo I (por ejemplo, Sp101), las proteínas que tienen un motivo LPXTG (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130), toxinas (por ejemplo, Ply), etc. Los ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas, o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas.

La composición inmunógena de la divulgación comprende al menos 2 proteínas seleccionadas del grupo que consiste en la familia tríada de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de proteínas LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de truncados de CbpX-truncados de LytX, pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. Sin embargo, si CbpX es PspC, entonces la segunda proteína no es PspA o PsaA. Preferentemente, la composición inmunógena comprende 2 o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en la familia tríada de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de proteínas LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de truncados de CbpX-truncados de LytX, pneumolisina (Ply), PspA, PsaA y Sp128. Más preferentemente, la composición inmunógena comprende 2 o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en la familia tríada de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de proteínas LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de truncados de CbpX-truncados de LytX, pneumolisina (Ply) y Sp128.

La familia Pht (tríada de polihistidina) 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 implicadas en unión de metal o nucleósido o en actividad enzimática, regiones superhelicoidales (3-5), un extremo N-terminal conservado y un extremo C-terminal heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos sometidas a prueba. También se han descubierto proteínas homólogas en otros estreptococos y en *Neisseria*. Los miembros preferidos de la familia comprenden PhtA, PhtB y PhtD. Más preferentemente, ello comprende PhtA o PhtD. Se entenderá, sin embargo, que los términos Pht A, B, D y E, se refieren a las proteínas que tienen secuencias divulgadas en las citas a continuación así como a variantes que se dan en la naturaleza (y artificiales) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es al menos un 90 %, idéntica a las proteínas a las que se hace referencia. Preferentemente es al menos idéntica al 95 % y lo más preferentemente es idéntica al 97 %.

En lo que respecta a las proteínas PhtX, PhtA se divulga en el documento WO 98/18930 y también se denomina Sp36. Como se destaca anteriormente, es una proteína de la familia tríada de polihistidina y tiene el motivo señal de tipo II de LXXC.

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

PhtB se divulga en el documento WO 00/37105 y también se denomina Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido que degrada C3, como se divulga en el documento WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia tríada de polihistidina y tiene el motivo señal de tipo II de LXXC. Un equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína Sp42 divulgada en el documento WO 98/18930. Un truncado de PhtB (aproximadamente 79 kD) se

divulga en el documento WO99/15675 que también se considera un miembro de la familia PhtX.

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

En cuanto a la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), miembros de esa familia se identificaron originalmente como proteínas neumocócicas que se podrían purificar por cromatografía de afinidad con colina. Todas las proteínas de unión a colina está unidas no covalentemente a restos de fosforilcolina de ácido teicoico de pared celular y ácido lipoteicoico asociado a membrana. Estructuralmente, hay varias regiones en común a lo largo de 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 conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión a colina conservada (C), compuesta de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se usa en esta solicitud, el término "familia de proteínas de unión a colina (CbpX)" se selecciona del grupo que consiste en proteínas de unión a colina como se identifican en los documentos WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD y CBpG. CbpA se divulga en el documento WO97/41151. CbpD y CbpG se divulgan en el documento WO00/29434. PspC se divulga en el documento WO97/09994. PbcA se divulga en el documento WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a colina divulgada en el documento WO 98/39450. Preferentemente las proteínas de unión a colina se seleccionan del grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Otro modo de realización preferente es truncados de CbpX en el que "CbpX" se define como anteriormente y "truncados" se refiere a proteínas de CbpX que carecen del 50 % o más de la región de unión a colina (C). Preferentemente tales proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Más preferentemente, los tales truncados de proteínas carecen de (i) la región de unión a colina y de (ii) una porción de la mitad N terminal de la proteína también, pero retienen al menos una región de repetición (R1 o R2). Más preferentemente aún, el truncado tiene 2 regiones de repetición (R1 y R2). Los ejemplos de dichos modos de realización preferentes son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en el documento WO99/51266 o en el documento WO99/51188, sin embargo, otras proteínas de unión a colina que carecen de una región de unión a colina similar también están contempladas dentro del alcance de esta divulgación.

La familia LytX son proteínas asociadas a membrana asociadas con la lisis celular. El dominio N-terminal comprende dominio(s) de unión a colina, sin embargo la familia LytX no tiene todas las características que se encuentran en la familia CbpA destacada anteriormente y por tanto por la presente invención, la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio C terminal contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas LytX. La familia comprende LytA, B y C. En lo que respecta a la familia LytX, LytA se divulga en Ronda et al., Eur J Biochem, 164: 621-624 (1987). LytB se divulga en el documento WO 98/18930 y también se denomina Sp46. LytC también se divulga en el documento WO 98/18930 y también se denomina Sp91. Un miembro preferido de esa familia es LytC.

Otro modo de realización preferido son truncados de LytX en los que "LytX" es según se define anteriormente y "truncados" se refiere a proteínas de LytX que carecen del 50 % o más de la región de unión a colina. Preferentemente tales proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Un ejemplo de tales truncados se puede encontrar en la sección de Ejemplos de esta divulgación.

Aún otro modo de realización preferente de esta divulgación son proteínas quiméricas (o fusiones) de truncados de CbpX-truncados de LytX. Preferentemente esto comprende NR1xR2 (o R1xR2) de CbpX y la porción C-terminal (extremo C, es decir, que carece de los dominios de unión a colina) de LytX (por ejemplo, extremo C de LytC o extremo C de Sp91). Más preferentemente CbpX se selecciona del grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Más preferentemente aún, es CbpA. Preferentemente, LytX es LytC (también denominado Sp91).

Otro modo de realización de la presente divulgación es una PspA o truncados de PsaA que carecen del dominio de unión de colina (C) y se expresan como una proteína de fusión con LytX. Preferentemente, LytX es LytC.

Neumolisina es una toxina multifuncional con una actividad citolítica (hemolítica) marcada y con actividad de activación del complemento (Rubins et al., Am. Respi. Cit Care Med, 153: 1339 -1346 (1996)). La toxina no se secretó por neumococos, pero se libera tras la lisis de neumococos sometidos a la influencia de autolisina. Sus efectos incluyen por ejemplo, la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias por monocitos humanos, la inhibición del batido de los cilios en el epitelio respiratorio humano y el decrecimiento de la actividad bactericida y la migración de neutrófilos. El efecto más obvio de neumolisina está en la lisis de glóbulos rojos, que implica unión a colesterol. Debido a que es una toxina, necesita detoxificarse (es decir, ser no tóxica para un ser humano cuando se proporciona en una dosificación adecuada para protección) antes de que se pueda administrar *in vivo*. La expresión y la clonación de neumolisina de tipo silvestre o natural se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, Gilman et al. (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) y Mitchell et al. (NAR, 18:4010 (1990)). La detoxificación de ply se puede llevar a cabo por medios químicos, por ejemplo, someter a tratamiento con formalina o con glutaraldehído o con una combinación de ambos. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica para diversas toxinas. De forma alternativa, ply se puede detoxificar genéticamente. Por tanto, la invención abarca derivados de proteínas neumocócicas que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutada" se usa en el presente documento para referirse a una molécula que ha sufrido delección, adición o sustitución de uno o más

aminoácidos usando técnicas bien conocidas por mutagénesis dirigida a sitio o cualquier otro procedimiento convencional. Por ejemplo, como se describe anteriormente, una proteína ply puede alterarse de forma que sea biológicamente inactiva mientras que aún mantiene sus epítomos inmunógenos, véanse, por ejemplo, WO90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67:981-985 (1999) ) y el documento WO99/03884.

- 5 Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "Ply" se refiere a una neumolisina mutada o destoxificada adecuada para uso médico (es decir, no tóxica).

En lo que respecta a PsaA y PspA, ambos se conocen en la técnica. Por ejemplo, PsaA y variantes de delección transmembrana de la misma se han descrito por Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dic.; 64(12):5255-62. PspA y variantes de delección transmembrana de la misma se han divulgado en, por ejemplo, los documentos US 5804193, WO 92/14488 y WO 99/53940.

10 Sp128 y Sp130 se divulgan en el documento WO00/76540.

Sp125 es un ejemplo de una proteína de superficie neumocócica con el motivo de LPXTG unido a la pared celular (en el que X es cualquier aminoácido). Se ha encontrado que cualquier proteína dentro de esta clase de proteína de superficie neumocócica con este motivo es útil dentro del contexto de esta divulgación y se considera por lo tanto una proteína adicional de la invención. Sp125 en sí misma se divulga en el documento WO 98/18930 y también se conoce como ZmpB -una metaloproteasa de cinc.

15 Sp101 se divulga en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia número y85993). Se caracteriza por una secuencia señal de tipo I.

20 Sp133 se divulga en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia número y85992). También se caracterizan por una secuencia señal de tipo I.

Las proteínas de la divulgación también se pueden combinar de forma beneficiosa. Combinaciones preferentes incluyen, pero no se limitan a, PhtD + NR1xR2, PhtD + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-extremo C de Sp91, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, Pht A+ NR1xR2, PhtA + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-extremo CI de Sp91, 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) es de CbpA o de PspC. Más preferentemente es de CbpA.

25 Una combinación particularmente preferida de proteínas neumocócicas comprende Ply (o un truncado o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma) + PhtD ( un truncado o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma) + NR1xR2 (o R1xR2). Preferentemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o de PspC. Más preferentemente es de CbpA.

30 La presente divulgación también abarca "equivalente(s) inmunológicamente funcional(es) a las proteínas de la divulgación". "Equivalente(s) inmunológicamente funcional(es)" se definen como un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo protector de las proteínas de la divulgación. Dichos epítomos están característicamente expuestos a la superficie, están altamente conservados y pueden provocar una respuesta de anticuerpos bactericidas en un huésped o evitar efectos tóxicos. Preferentemente, el equivalente funcional tiene al menos 15 y preferentemente 30 o más aminoácidos contiguos de la proteína de la divulgación se pueden usar con la condición de que sean capaces de aumentar sustancialmente la misma respuesta inmune que la proteína natural. La posición de epítomos de linfocitos B potenciales en una secuencia proteica se puede determinar fácilmente identificando péptidos que sean tanto expuestos en superficie como antigénicos usando una combinación de dos procedimientos: predicción de 2D-estructura y predicción de índice antigénico. La predicción de 2D-estructura se puede hacer usando el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, Reino Unido). El índice antigénico se puede calcular en base al procedimiento descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

35 La presente divulgación tiene ventajas sobre vacunas polisacáridicas de *S. pneumoniae* porque múltiples composiciones (inmunógenas) de proteínas de *S. pneumoniae* pueden incluir mayor protección cruzada a través de los numerosos serotipos, pueden inhibir adicionalmente la adherencia y la formulación de colonias y pueden aumentar potencialmente anticuerpos que puedan neutralizar las funciones tóxicas/enzimáticas de un patógeno. Además, antígenos adicionales de superficie proporcionan un medio para estimular adicionalmente la opsonofagocitosis.

40 La presente divulgación también contempla vacunas de combinación que proporcionan protección frente a una variedad de patógenos diferentes. Muchas vacunas pediátricas ahora se administran como una vacuna de combinación con el fin de reducir el número de inyecciones que tiene que recibir un niño. Por tanto para vacunas pediátricas se pueden formular otros antígenos de otros patógenos con las vacunas de la divulgación. Por ejemplo las vacunas de la invención se pueden formular con (o administrar por separado, pero al mismo tiempo) la bien conocida combinación de vacuna "trivalente" que comprende toxoide diftérico (DT), toxoide tetánico (TT) y componentes pertúsicos [típicamente toxoide pertúsico destoxificado (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) con pertactina (PRN) y/o aglutinina 1+2 opcionales], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biologicals) que contiene antígenos DT, TT, PT, FHA y PRN, o con un componente de tos ferina de células enteras por

ejemplo como se comercializa por SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como Tritanrix™. La vacuna combinada también puede comprender otros antígenos, tales como el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), antígenos del virus de la polio (por ejemplo virus de la polio inactivado trivalente -IPV), proteínas de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis*, proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificables, proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis*.

Los ejemplos de antígenos proteicos preferidos de *Moraxella catarrhalis* que se pueden incluir en un vacuna de combinación (en especial, para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [documentos WO97/41731 (Antex) y WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y/o LbpB [documento WO98/55606 (PMC) ]; TbpA y/o TbpB [documentos WO97/13785 y WO 97/32980 (PMC) ]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento 93/03761 (Universidad de Tejas)]; OmpCD; HasR (documento PCT/EP99/03824); PilQ (documento PCT/EP99/03823); OMP85 (documento PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 9917977.2); lipo10 (documento GB 9918208,1); lipo11 (documento GB 9918302,2); lipo18 (documento GB 9918038,2); P6 (documento PCT/EP99/03038); D15 (documento PCT/EP99/03822); Omp1A1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE. Los ejemplos de antígenos proteicos de *Haemophilus influenzae* no tipificables que se pueden incluir en un vacuna de combinación (en especial para la prevención de la otitis media) incluyen: proteína fimbriada [ (documento US. 5766608 - Ohio State Research Foundation) ] y fusiones que comprenden péptidos de los mismos [por ejemplo fusiones peptídicas de LB 1(f), documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs) ]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York) ]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641) ; proteína D (documento EP 594610) ; P2; y P5 (documento WO 94/26304).

En otro modo de realización, diversos antígenos enumerados anteriormente se pueden incluir en la composición inmunógena tales como antígenos presentes sobre la superficie de la membrana externa (ampollas) fabricados a partir de las bacterias de las que se derivan.

Otras combinaciones contempladas son las proteínas de *S. pneumoniae* en combinación con antígenos víricos, por ejemplo, a partir del virus de la gripe (atenuado, dividido nuevo, o subunidad [por ejemplo, glucoproteínas de superficie neuraminidasa (AN) y hemaglutinina (HA). Véase, por ejemplo, Chaloupka I. Et al, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127], VRS (por ejemplo, antígenos F y G o fusiones F/G, véase, por ejemplo, Schmidt A. C. et al, J Virol, mayo de 2001, p. 4594 - 4603), PIV3 (por ejemplo, proteínas HN y F, véase Schmidt et al. supra), varicela (por ejemplo, glucoproteínas I-V atenuadas, etc.) y cualquier/cualesquiera (o todos) el/los componente(s) de MMR (sarampión, parotiditis, rubéola).

#### Antígenos polisacáridicos de la divulgación

La presente solicitud también contempla vacunas de combinación con 2 o más proteínas de *S. pneumoniae* combinadas con polisacáridos distinto de *S. pneumoniae*. Estos polisacáridos se puede aislar a partir de, por ejemplo, *H. influenzae*, *H. influenzae* tipo B (Hib), *N. meningitidis* grupos A, C, W, Y, estreptococos distintos de *S. pneumoniae* (por ejemplo, Streptococcus de grupo B, *S. pyogenes*, etc.), Staphilococcus (por ejemplo, *S. aureus*, *S. epidermidis*), *E. coli*, Enterococcus (por ejemplo., *E. faecalis* y *E. faecium*), etc. Preferentemente, los polisacáridos son de *H. influenzae* tipo B (Hib), y/o de *N. meningitidis* grupos A, C, W135, y/o Y.

Como se menciona anteriormente, un problema asociado con el enfoque polisacáridico de la vacunación, es el hecho de que los polisacáridos *per se* son malos inmunógenos. Para superar esto, los polisacáridos se pueden conjugar con vehículos proteicos, que proporcionan linfocitos T coadyuvantes presenciales. Se prefiere, por lo tanto, que los polisacáridos utilizados se unan a una proteína vehículo tal. Los ejemplos de tales vehículos que en la actualidad se usan comúnmente para la producción de inmunógenos polisacáridicos incluyen toxoides diftéricos y tetánicos (DT, DT CRM197, otros mutantes de DT, por ejemplo la posición Glu-148, etc. [véanse, por ejemplo, documentos US 4.709.017, WO93/25210, WO95/33481, etc.] y TT (y fragmento C de TT) respectivamente), hemocianina de lapa californiana (KLH), OMPC de *N. meningitidis* y el derivado proteico purificado de tuberculina (PPD).

Otro vehículo para las composiciones inmunógenas basadas en polisacáridos (o vacunas) es proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento EP 594610-B), o fragmentos de la misma. Los fragmentos adecuados para usar incluyen fragmentos que comprenden epítomos de T-coadyuvantes. En particular un fragmento de proteína D contiene preferentemente el tercio N-terminal de la proteína.

El polisacárido puede enlazarse a la proteína vehículo por cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, por Likhite, patente de los EE. UU 4.372.945 y por Armor et al., patente de los EE. UU 4.474.757). Preferentemente, se lleva a cabo la conjugación CDAP (documento WO 95/08348). Para potenciar la inmunogenicidad, los polisacáridos pueden dimensionarse (despolimerizarse), coadyuvarse, liofilizarse, o estar conjugados con diferentes proteínas vehículo.

#### Coadyuvantes TH1 de la divulgación

Las vacunas de la presente divulgación son preferentemente coadyuvadas. Los coadyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como un gel de dióxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero pueden ser también una sal de calcio, magnesio, hierro o cinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónicamente o aniónicamente derivatizados, o polifosfacenos.

Se prefiere que el coadyuvante esté seleccionado para que sea un inductor preferencial de un tipo de respuesta TH1. Tales niveles altos de citocinas de tipo Th-1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno dado, mientras que altos niveles de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

- 5 Es importante recordar que la distinción de respuesta inmune de tipo Th1 y de tipo Th2 no es absoluta. En realidad un individuo soportará una respuesta inmune que se describe como que es predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, es a menudo conveniente considerar las familias de citocinas en términos de aquello descrito en clones de células T CD4 +ve 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, p.: 145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas a menudo directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 no se producen por células T, tales como IL-12. En contraste, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Los sistemas de coadyuvantes adecuados que promueven una respuesta predominantemente de Th1 incluyen: monofosforil lípido A o un derivado del mismo, en particular monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación véase el documento GB 2220211 A); y una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con bien una sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o bien una emulsión de aceite en agua. En tales combinaciones, antígeno y 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, permitiendo administración de señales antigénicas y/o inmunoestimuladoras más eficaz. Los estudios han demostrado que 3D-MPL puede potenciar adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno alumbre-adsorbido [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708-14; documento EP 689454-B1].

Un sistema potenciado implica la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 se desactiva con colesterol como se divulga en el documento WO 96/33739.

- 25 Se describe una formulación de coadyuvante particularmente potente que involucra QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua en el documento WO 95/17210 y es una formulación preferida.

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

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

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

- 35 En un aspecto adicional de la presente invención hay proporcionada una vacuna como se describe en el presente documento para usar en medicina. En una realización hay un procedimiento de evitación o mejora de neumonía en un ser humano de edad avanzada que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de una vacuna de la invención y opcionalmente un coadyuvante Th1, a dicho paciente de edad avanzada.

- 40 En un modo de realización adicional se proporciona un procedimiento de prevención o de mejora de la otitis media en infantes (de hasta 24 meses) o de niños pequeños (típicamente de 24 meses a 5 años), que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de una vacuna que comprende proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención y opcionalmente un coadyuvante Th1, a dicho infante o niño pequeño.

#### Preparaciones vacunales de la divulgación

- 45 Las preparaciones de vacunas de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un mamífero (preferentemente un paciente humano) susceptible de infección, por medio de administrar dicha vacuna por medio de vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección por medio de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio 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 de pneumococos puede prevenirse más eficazmente, atenuando así la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una dosis única, los componentes de la misma se pueden coadministrar también conjuntamente al mismo tiempo o a tiempos diferentes (por ejemplo si los polisacáridos están presentes en una vacuna estos podrían administrarse por separado al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de la combinación de la proteína bacteriana para coordinación óptima de las respuestas inmunes unas con respecto a otras). Además de una única vía de administración, se pueden usar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, los antígenos víricos se pueden administrar ID (intradérmicamente), mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar IM (intramuscularmente) o IN (intranasalmente). Si los polisacáridos están presentes, se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de sensibilización e 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 adversos, significativos, en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplea y de cómo se presenta. El contenido de antígenos proteicos en la vacuna estará típicamente en el intervalo de 1-100 µg, preferentemente de 5-50 µg, lo más típicamente en el intervalo de 5-25 µg. Si los polisacáridos están incluidos, en general se espera que cada dosis comprenda 0,1-100 µg de polisacáridos, preferentemente 0,1-50 µg, más preferentemente 0,1-10 µg, de los que 1 a 5 µg es el intervalo más preferible.

Cantidades óptimas de componentes para una vacuna concreta se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas. Típicamente una vacuna comprenderá antígeno (proteínas), un coadyuvante y excipientes o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

Aunque las vacunas de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma un modo de realización de la presente divulgación. La piel humana comprende una cutícula "de cuerno", llamada el estrato córneo, que reviste la epidermis. Bajo esta epidermis está una capa denominada la dermis, que a su vez reviste el tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna dentro de la piel y en particular la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, que puede también estar asociada con una cantidad de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en el presente documento forma una característica preferida de la presente divulgación.

La técnica convencional de la inyección intradérmica, el "procedimiento de Mantoux", comprende las etapas de limpiar la piel y después estirar con una mano y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) orientada hacia arriba la aguja se inserta en un ángulo de entre 10-15°. Una vez que el bisel de la aguja está insertado, el barril de la aguja se baja y además se hace avanzar proporcionando mientras una ligera presión para elevarla bajo la piel. El líquido se inyecta a continuación muy lentamente formando así una ampolla o bulto sobre la superficie de la piel, seguido por retirada lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que están específicamente diseñados para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección a presión descritos por ejemplo en los documentos 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 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringuillas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para la administración balística de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicados a la superficie de la piel (administración transdérmica o transcutánea documento WO 98/20734; documento WO 98/28037).

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

El contenido de antígenos en las vacunas cutáneas o intradérmicas puede ser similar a dosis convencionales como se encuentran en vacunas intramusculares. En consecuencia, los antígenos proteicos presentes en las vacunas intradérmicas pueden estar en el intervalo de 1-100 µg, preferentemente 5-50 µg. Asimismo, si están presentes, la cantidad de antígeno conjugado a polisacárido en cada dosis de vacuna se espera que comprenda en general 0,1-100 µg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 µg de polisacárido, preferentemente de 0,1-10 g de polisacárido y puede estar entre 1 y 5 µg. Sin embargo, es una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas que las formulaciones puedan ser de "dosis baja". En consecuencia los antígenos proteicos en vacunas de "dosis baja" están presentes preferentemente en tan poca cantidad como 0,1 a 10 µg, preferentemente 0,1 a 5 µg por dosis; y si están presentes los antígenos conjugados polisacáridicos pueden estar presentes en el intervalo de 0, µ01-1 g y preferentemente entre 0,01 a 0,5 µg de polisacárido por dosis.

Como se usa en el presente documento, el término "administración intradérmica" quiere decir administración de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no estará necesariamente situada exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa en la piel situada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie en la piel humana, pero hay una determinada cantidad de variación entre 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 está situada entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea más abajo.. En función del modo de administración, la vacuna puede estar localizada en último término únicamente o principalmente dentro de la dermis, o puede en última instancia distribuirse dentro de la epidermis y la dermis.

En otro aspecto la presente divulgación puede contener ADN que codifica una o más proteínas de *S. pneumoniae*, de modo que la proteína se genera in situ. Los polinucleótidos pueden estar presentes en cualquiera de una diversidad de sistemas de administración conocidos por aquellos de habilidad normal en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácidos nucleicos, sistemas de expresión bacterianos y víricos. Se conocen bien en la técnica numerosas técnicas de administración, tales como aquellas descritas por Rolland, (Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998) y referencias citadas en lo mencionado. Sistemas de expresión de ácidos nucleicos apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para expresión en el paciente (tal como un promotor adecuado y una señal de terminación). Cuando el sistema de expresión es un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o bacteria, el gen de interés se puede insertar dentro del genoma de un virus o bacteria vivo/a recombinante. La inoculación y la infección in vivo con este vector vivo conducirá a expresión in vivo del antígeno y a inducción de respuestas in vivo. Los virus y bacterias usados para este propósito son, por ejemplo: poxvirus (por ejemplo; vaccinia, viruela aviar, viruela del canario), alfavirus (virus Sindbis, virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana), adenovirus, virus adenoasociados, picornavirus (poliovirus, rinovirus), herpesvirus (virus varicela zóster, etc.), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos, o estar atenuados de varias maneras con el fin de obtener vacunas vivas. Dichas vacunas vivas también forman parte de la invención.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento de fabricación de una formulación de vacuna como se describe en el presente documento, en la que el procedimiento comprende mezclar una combinación de proteínas de acuerdo con la invención.

Preferentemente, las composiciones antigénicas (y vacunas) que contienen polisacáridos descritos anteriormente se liofilizan hasta que se vayan a utilizar, momento en el que se reconstituyen improvisadamente con diluyente. Más preferentemente se liofilizan en presencia de 3D-MPL y se reconstituyen improvisadamente con solución salina.

La liofilización de las vacunas se conoce bien en la técnica. Típicamente la vacuna líquida se seca por congelación en presencia de un agente antiaglomerante por ejemplo azúcares tales como sacarosa o lactosa (presentes a una concentración inicial de 10-200 mg/ml). La liofilización se produce típicamente sobre una serie de etapas, por ejemplo un ciclo de partida a 69 °C, ajustando gradualmente a -24 °C durante 3 horas, manteniendo después esta temperatura durante 18 horas, ajustando a continuación gradualmente a -16 °C durante 1 hora, manteniendo después esta temperatura durante 6 horas, a continuación ajustando gradualmente a +34 °C durante 3 horas y finalmente manteniendo esta temperatura durante 9 horas.

Las composiciones y vacunas inmunógenas se pueden evaluar en diversos modelos animales o con sueros humanos. Como una ilustración, los siguientes modelos animales se pueden usar para evaluar infección neumocócica. Los ratones C3H/HeJ (6 a 8 semanas de edad) puede ser inmunizados por vía subcutánea con 15µ g de proteína coadyuvada con 50 µl de CFA, seguido 3-4 semanas después por refuerzo con 15 µg de proteína con IFA. Para demostrar protección pasiva y activa protección frente a la infección sistémica, los ratones se pueden administrar por vía intraperitoneal con sueros inmunitarios o proteínas inmunitarias antes de la exposición por inyección intraperitoneal con 15 a 90 LD50 de neumococos en la semana 8-10. Adicionalmente, las proteínas se pueden poner a prueba en un modelo de colonización nasofaríngea de ratón de (Wu et al. Microbial Pathogenesis 1997; 23:127-137).

Además de ratones, las ratas de corta edad son susceptibles a la colonización e infección por *S. pneumoniae*. En estudios de protección pasiva, la administración de sueros inmunitarios de ratón (100 ul i.p. o 10 ul i.n.) se puede realizar antes de la exposición con administración intranasal de *S. pneumoniae* (10 ul) en crías de rata de corta edad de 2-5 días. La colonización se puede determinar plaqueando lavados nasales (20-40 ul instilados, 10 ul retirados).

Interacciones favorables entre los componentes proteínicos de la vacuna de combinación se pueden demostrar mediante la administración de una dosis de cada proteína en la vacuna que sería sub-protectora en una vacuna monovalente. La eficacia protectora incrementada de la vacuna de combinación comparada con vacunas monovalentes se puede atribuir a una interacción favorable entre los componentes.

La presente invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos se llevan a cabo usando técnicas estándar, que se conocen bien y son rutinarias para aquellos expertos en la técnica, salvo donde se describa lo contrario en detalle. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Construcción y expresión de antígenos

#### 50 NR1xR2

CbpA es una proteína expuesta en superficie de 75 kDa que consiste en diversos dominios. El dominio N-terminal comprende 2 repeticiones altamente conservadas (R1 y R2) y el dominio C terminal comprende 10 secuencias repetitivas directas, en tándem, de 20 aminoácidos. Un truncado de CbpA se preparó para producir NR1XR2, es decir, sin el dominio de unión a colina.

55 El gen NR1XR2 se amplificó, por medio de PCR, a partir de ADN obtenido a partir de una cepa de serotipo 4 de *S. pneumoniae* (véanse, por ejemplo, los documentos WO97/41157, o WO99/51266). Se llevó a cabo PCR con el

sistema de PCR de alta fidelidad Expandir, o Hi-Fi (Roche). Ello está compuesto de una mezcla que contiene Taq polimerasa y de una polimerasa de corrección de errores. Debido a la inherente actividad de corrección de errores exonucleasa 3'-5', el uso de Hi-Fi da como resultado una fidelidad 3 veces superior de síntesis de ADN en comparación con Taq polimerasa.

- 5 Se clonaron fragmentos de PCR en vector pGEM-T a partir de pGEM-T Vector Systems (Promega). Esta etapa es necesaria para facilitar digestión con enzimas de restricción de fragmento de PCR para futura ligación. El vector pGEM-T se proporciona lineal y contiene salientes 3'-T. Estos salientes facilitan la inserción de los productos de la PCR generados por polimerasas termoestables que añaden una única desoxiadenosina, en una forma independiente de la plantilla, a los extremos 3' del fragmento amplificado.
- 10 Los fragmentos y vectores se purificaron después de digestiones enzimáticas (digestiones *NdeI* y *XbaI*) de acuerdo con el artículo de Benore-Parsons et al. (Nucleic Acids Research, 23, 4926-4927, 1995). La lámina de agarosa se liofilizó completamente durante 3-4 horas. Una solución de etanol-TE 1:1 se añadió al gel liofilizado. La muestra se mezcló suavemente durante 1 h, se comprimió la agarosa y se retiró completamente por centrifugación. ADN se recuperó del eluyente por precipitación con etanol.
- 15 El ADN que codifica NR1xR2 se clonó en un vector que contenía promotor L largo de fago X. La proteína de interés podría inducirse por calor cuando está presente en cepa AR 58 de *E. coli*, o por ácido nalidixico en cepa AR 120 de *E. coli*.

- Un precultivo de bacterias se hizo durante la noche a 30 °C. Este precultivo se diluye aproximadamente 40 veces en un volumen total de 20 ml y se puso a 30 °C hasta una D.O. de 0,4-0,6. A continuación, la inducción de calor se realizó a 42 °C. Se tomaron muestras a diferentes puntos temporales. Un ml de cultivo se centrifugó 5 minutos a 7.000 r.p.m. El sobrenadante del cultivo se conservó a -20 °C y el sedimento (extracto total) se resuspendió en 500 µl de tampón de muestra (análisis de transferencia de bandas de western o análisis SDS-PAGE), o en 500 µl de tampón de lisis y se incubó durante 30 minutos a 37 °C (ELISA). La composición de tampón de lisis es: SDS al 0,1 %, desoxicolato al 0,1 %, citrato de Na: 0,015 M.
- 20
- 25 Se analizaron las muestras en un SDS-PAGE, se cargaron en gel al 4-20 % (Novex, Invitrogen). La migración se realizó a 200 V. Se realizó la tinción de azul de Coomassie. Se cargaron muestras en gel al 4-20 % (Novex, Invitrogen), por realización de prueba de bandas de Western. Se realizó migración a 200 V. El gel se transfirió a nitrocelulosa y las manchas se revelaron con anticuerpos policlonales α-NR1XR2 de conejo (primer anticuerpo) y un α-anticuerpo de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (segundo anticuerpo).
- 30 Una banda de aproximadamente 55 kDa se observó por análisis SDS-PAGE. Un clon, 28B2, se eligió en base a los análisis por SDS-PAGE y se transfirió para fermentación. Este clon se secuenció y su secuencia se confirmó (aminoácidos 39 (es decir, después de secuencia señal) a 446 = 406 aminoácidos).

- La solubilidad de NR1XR2 también se estudió, después de la lisis de bacterias inducidas durante la noche seguida por centrifugación. Un análisis de SDS-PAGE y una prueba de ELISA se llevaron a cabo. NR1XR2 parecía estar principalmente (> 95 %) recuperado en la fracción soluble.
- 35

### **R1xR2, PhtD, Sp91, (N)R1xR2-Sp91[dominio C-terminal] y Ply**

- Estos genes también se clonaron, se secuenciaron y se expresaron de manera similar a NR1xR2. R1xR2 contiene aminoácidos 177 a 443 de CbpA (de *S. pneumoniae* serotipo 4N), PhtD contiene 21 aminoácidos (es decir, después de secuencia señal) hasta el final (aminoácido 839 de *S. pneumoniae* serotipo 4N), Sp91 comienza en el aminoácido 20 (VAA) hasta el final. Para las proteínas de fusión, R1xR2-extremo C Sp91 contiene aminoácidos 177-446 de CbpA y aminoácidos 271 hasta la detención de la traducción; NR1xR2-extremo C de Sp91 contiene aminoácidos 39-446 de CbpA y aminoácidos 271 hasta la detención de la traducción. Para ambas proteínas de fusión, se encuentran 2 aminoácidos adicionales (GS) entre las secuencias (N)R1xR2 y extremo C de Sp91. Para todas las construcciones, un ATG se ha introducido 5' del inicio del gen para permitir la transcripción y traducción, lo que quiere decir que existe un extremo N terminal de metionina adicional en la parte frontal de cada secuencia mencionada anteriormente.
- 40
- 45

### **Ejemplo 2. Serología**

Usando los sueros a partir de los estudios clínicos, se midieron ELISA para la respuesta de anticuerpos que se desarrolla de forma natural a proteínas de *S. pneumoniae*.

#### 2.1 Procedimiento experimental

- 50 • Muestras de suero
- Los sueros apareados de los infantes se recogieron cuando eran de 2 a 4 meses de edad y cuando eran de 6 a 12 meses de edad, respectivamente (N = 20, estudios DTPa VHB).
  - Sueros de adultos de 20 años de edad (N = 50).

- Sueros de adultos de > 65 años de edad (N = 140).

• Procedimientos de ELISA

5 Se revistieron inmuno-placas durante toda una noche a 4 °C con 1 mg/ml de cada proteína. Se realizaron dos diluciones seriadas de los sueros (comenzando a una dilución 1/10) se incubaron a continuación durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con agitación. Se realizó inmunodetección usando un anticuerpo monoclonal IgG anti-humano acoplado a peroxidasa (Strateck, HP6043) diluido 4000 veces e incubado durante 30 minutos a TA con agitación. Después de revelación, las valoraciones de punto medio se calcularon por SoftmaxPro. Se consideraron los sueros con valoraciones > 10 como positivos. Para el cálculo de media geométrica, un valor de 5 (mitad del valor de corte) se atribuyó de forma arbitraria a los sueros negativos.

10 Las concentraciones de IgG expresadas como mg/ml se establecieron comparando densidades ópticas de muestra (D.O.) a la curva de D:O. de cromóforo-IgG (Jackson) se atraparon en la placa por anticuerpos de cabra IgG anti-humano y se revelaron por el mismo anticuerpo marcado con peroxidasa que anteriormente.

2.2 Resultados

2.2.1 Serología de proteínas estreptocócicas en infantes

15 Las valoraciones de anticuerpos más altas y las tasas de seropositividad más altas medidas en sueros de infantes de 2 a 4 meses de edad se obtuvieron con PhtD, PsaA, Sp128, NR1xR2 y en menor medida, con Sp91 y Ply. No se detectó ninguna respuesta o se detectaron respuestas bajas a Sp101 y Sp130. Sp46 y PhtA no se sometieron a prueba (cuestión de disponibilidad de material).

20 Las respuestas de anticuerpos generalmente disminuyeron en sueros de los mismos sujetos recogidos cuando estos eran de 6 a 12 meses de edad, lo que sugiere que las valoraciones altas se deben principalmente a anticuerpos maternos transferidos pasivamente.

25 Sin embargo, en determinados infantes, la respuesta inmunitaria para algunas proteínas se incrementó con la edad, probablemente como consecuencia de la exposición natural a neumococos. El antígeno al que se refiere principalmente esta seroconversión era claramente PsaA. Dependiendo del sujeto se mostró también aumento de los niveles de anticuerpos para PhtD, NR1xR2, Sp128, Sp91 y Ply. Solo se observó variación marginal en la respuesta humoral a Sp101 y Sp130. (Véanse las figuras 1 y 2).

2.2.2. Serología de proteínas estreptocócicas en adultos jóvenes

30 De acuerdo con la media geométrica de las valoraciones, PhtD, PhtA y NR1xR2 son las proteínas más inmunógenas en la población adulta joven evaluada, seguidas a continuación por Sp128, Ply y Sp91. Todos los sujetos tuvieron anticuerpos detectables para estas proteínas. Se midieron respuestas inferiores a Sp46 y en especial a Sp130 y Sp101. PsaA no se sometieron a prueba (no están suficientemente disponibles en suero). (Véanse las figuras 3 y 4).

2.2.3. Serología de proteínas estreptocócicas en adultos de edad avanzada

35 Había una clara disminución de los niveles de anticuerpos a proteínas estreptocócicas en seres humanos de edad avanzada en comparación con adultos jóvenes. En personas de edad, el mejor inmunógeno es PhtD, seguido de Sp128, NR1xR2, Sp91, Ply y PsaA. Solamente se midieron respuestas marginales a Sp101 y Sp130. Sp46 y PhtA no se sometieron a prueba (cuestión de disponibilidad de material). (Véanse las figuras 5 y 6).

Tabla 1, media geométrica de las concentraciones de IgG (GMC), expresada como mg/ml, en personas de edad avanzada

Proteína	IgG (GMC, µg/ml)
PhtD	19
NR1xR2	3,5
Sp91	2,5
Ply	2,3

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunógena que comprende al menos 2 proteínas de *S. pneumoniae* en la que una de las proteínas es PhtD y la otra proteína es neumolisina destoxificada (Ply).
- 5 2. La composición inmunógena de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente NR1xR2 o R1xR2 de CbpA o PspC.
3. La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-2 en la que la neumolisina está destoxificada químicamente.
4. La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-2 en la que la neumolisina está destoxificada genéticamente.
- 10 5. La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-4 que comprende adicionalmente otro antígeno seleccionado del grupo que consiste en el antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), antígenos del virus de la polio, proteínas de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis*, proteínas no tipificables de *Haemophilus influenzae* y proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B.
- 15 6. La composición inmunógena de la reivindicación 5 en la que el antígeno adicional es una proteína de *Haemophilus influenzae* no tipificable.
7. La composición inmunógena de la reivindicación 6 en la que el antígeno adicional es Proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipificable.
8. La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-7 que comprende adicionalmente un coadyuvante.
- 20 9. La composición inmunógena de la reivindicación 8, en la que el coadyuvante es un inductor preferencial de una respuesta de tipo TH1.
10. Una vacuna que comprende la composición inmunógena de las reivindicaciones 1-9.
11. Uso de la vacuna de la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para la prevención de la neumonía en pacientes mayores de 55 años de edad.
- 25 12. Uso de la vacuna de la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para la prevención de otitis media en infantes.
13. Un procedimiento de fabricación de una vacuna según la reivindicación 10 que comprende las etapas de: seleccionar y aislar dos proteínas de *S. pneumoniae* diferentes que son PhtD y neumolisina destoxificada (Ply); y mezclar dichas proteínas junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1, % de seropositividad en infantes

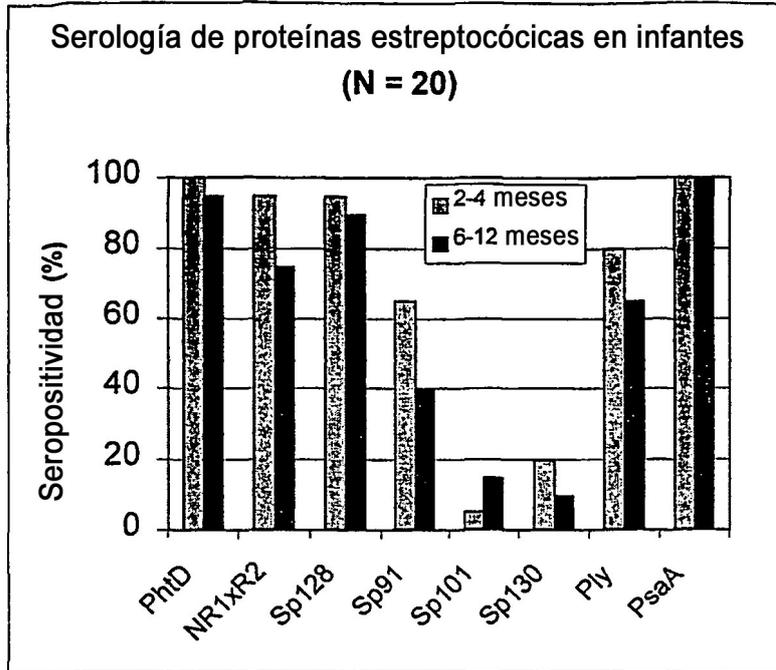


Figura 2, seroconversión con la edad en infantes

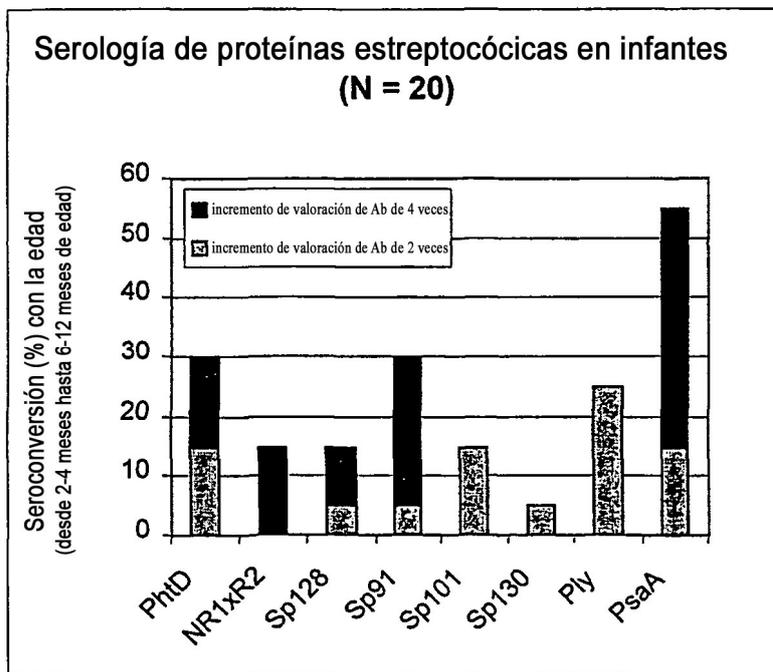


Figura 3, valoraciones de punto medio en adultos jóvenes

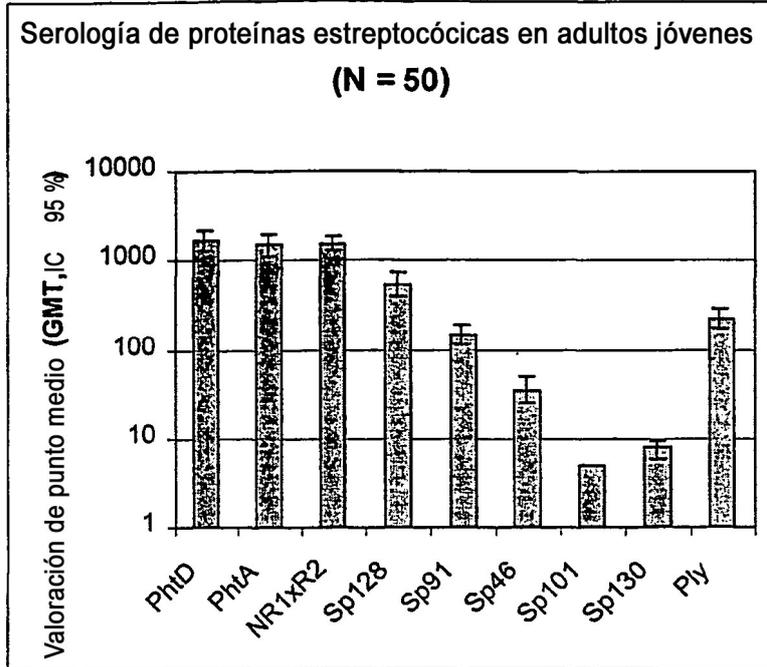


Figura 4, % de seropositividad en adultos jóvenes

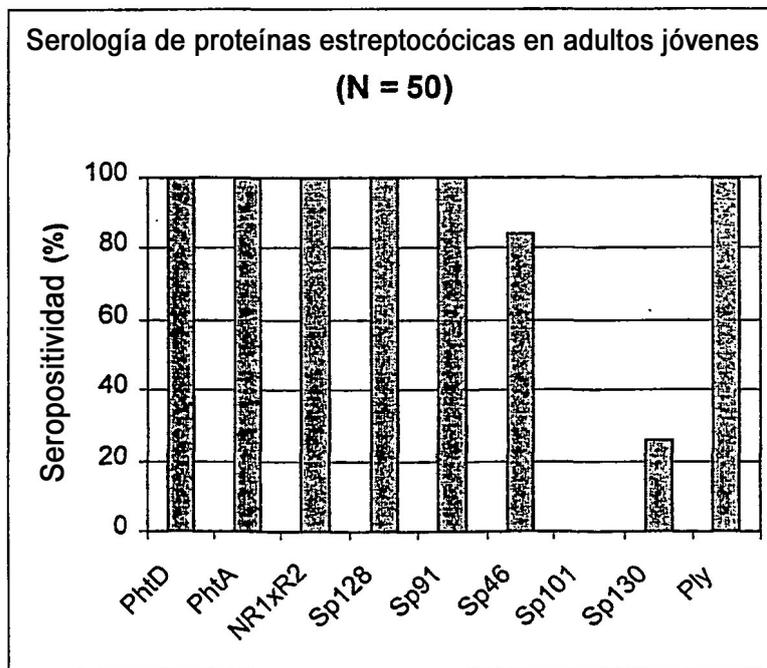


Figura 5, valoraciones de punto medio en personas de edad avanzada

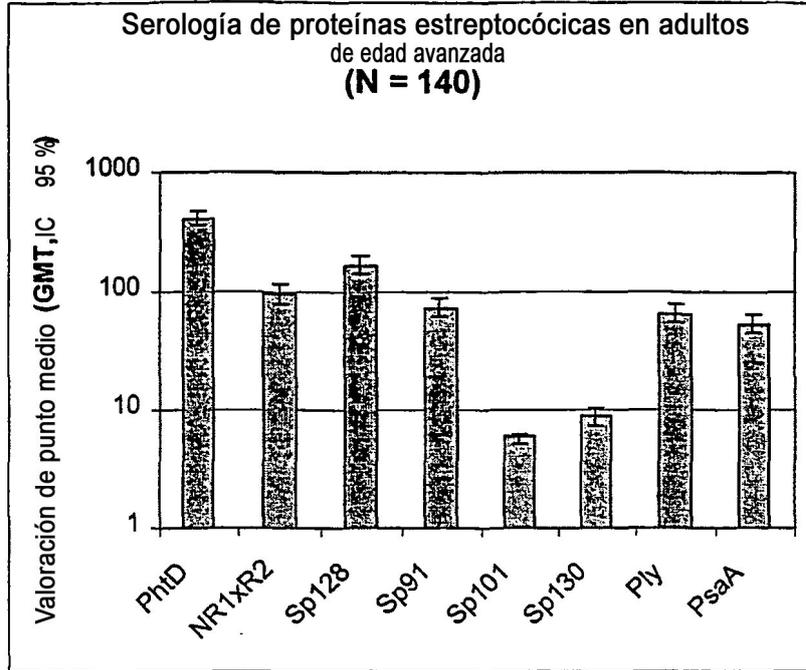


Figura 6, % de seropositividad en personas de edad avanzada

