

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 853**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011 E 11817824 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2566508**

54 Título: **Conjugación de polisacárido con enterotoxina termolábil (LT) de E. coli desintoxicada usada como vacuna**

30 Prioridad:

03.05.2010 US 330650 P

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

12.11.2015

73 Titular/es:

**DCB-USA LLC (100.0%)
1007 North Orange Street Ninth Floor New Castle
County
Wilmington, Delaware 19801, US**

72 Inventor/es:

**HSU, YU-SHEN;
KOU, I-LING;
HUNG, KUO-CHAN;
LU, YUAN-HSIN y
YUAN, TA-TUNG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 550 853 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).

Conjugación de polisacárido con enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli* desintoxicada usada como vacuna**Descripción****5 Antecedentes de la invención:**

Las vacunas de polisacárido, cuando se preparan sin proteína transportadora, carecen de respuestas de memoria inmunitaria. Las vacunas conjugadas actualmente conocidas incluyen polisacáridos capsulares bacterianos tales como *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* grupo C y *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 19F, 23F. Estas vacunas están conjugadas covalentemente con una proteína transportadora, tal como el toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, una toxina diftérica no tóxica mutante, o proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*. Estas vacunas de conjugado de polisacárido podrían inducir respuesta dependiente de linfocitos T, especialmente en bebés por debajo de la edad de dos años; y podrían sensibilizar la memoria inmunológica a largo plazo, producir anticuerpo de alta afinidad y podrían reducir la tasa de colonización y transmisión nasofaríngea.

Sin embargo, la mayoría de las vacunas de conjugado de polisacárido bacterianas actualmente comercializadas aplicaron toxoide tetánico (TT) o toxoide diftérico (DT) como proteína transportadora. TT y DT, estas dos proteínas de toxoide, son vacunas habituales para bebés/niños; la vacunación de alta frecuencia de TT y DT dentro de un corto tiempo podría tener un impacto sobre la inmunogenicidad y seguridad (Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. *Infect. Immun.* 1998; 66(5):2093-8; Immunogenicity and safety of a combination pneumococcal-meningococcal vaccine in infants: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 293 (14): 1751-8). Por tanto, la presente invención proporciona un nuevo tipo de la proteína transportadora LTS61K para su uso en la vacuna de conjugado.

El documento EP 0 172 107 A1 desvela un conjugado de una subunidad de LTB no tóxico (LT-BNT) y un polisacárido capsular bacteriano. El conjugado obtenido de LT-BNT y polisacárido estuvo en forma agregada, y así se usó urea 5 M en el proceso de conjugación para eliminar los agregados. Como la urea es un desnaturizante de proteínas, la utilización de urea afectaría la estructura y actividad de la subunidad de LTB, y así la subunidad de LTB tratada ya no se presenta como una estructura pentámera completa en su forma natural.

Resumen de la invención:

La presente invención incluye la conjugación de polisacáridos con una enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli* desintoxicada en la que LT es una holotoxina y es una proteína mutante LTS61K que tiene una sustitución de lisina en la posición correspondiente a la posición 61 de SEC ID N°: 5 útil como vacuna para proteger o inmunizar contra los efectos de bacterias infecciosas tales como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* y aliviar la diarrea del viajero producida por *E. coli* enterotoxigénica.

Un aspecto de la presente invención se refiere a vacunas de polisacárido-LTS61 K covalentemente conjugadas aisladas en forma purificada. Estos productos conjugados tienen inesperadamente propiedades inmunogénicas y bactericidas superiores en mamíferos. Otro aspecto se refiere al uso de polisacárido-LTS61K conjugado para la preparación de una vacuna para un mamífero en necesidad de protección de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). Las vacunas de la presente invención estimulan la respuesta de linfocitos T colaboradores, presentan fuerte respuesta al refuerzo tras la re-exposición y tienen altos títulos de anticuerpos.

Todavía otro aspecto de la invención se refiere al método de producción de polisacárido-LTS61K conjugado por aminación reductora y aislamiento del producto conjugado purificado. Según la presente invención, se descubrió que el método preferido de conjugar polisacárido y LTS61K para preparar la vacuna de la presente invención es la oxidación con peryodato del PS nativo, seguido de aminación reductora.

La LTS61K empleada en los conjugados de la presente invención se describe en la solicitud PCT número PCT/US2007/075801, presentada el 13 de agosto de 2007; en las solicitudes de EE.UU. Números US 1 1/779419 presentada el 18 de julio de 2007, US 12/120.953 presentada el 15 de mayo de 2008 y US 12/729.649 presentada el 23 de marzo de 2010; y en la solicitud de patente de Taiwán N° 95139707 presentada el 27 de octubre de 2006 y concedida en enero de 2009.

Breve descripción de las figuras:

La Figura 1 es una representación generalizada de una proteína transportadora LT.

La Figura 2 es la representación estructural de sacáridos de PRP de Hib.

La Figura 3 muestra varios métodos de conjugación.

La Figura 4 muestra un método de aminación reductora según la presente invención.

La Figura 5 representa la conjugación de PRP y LTS61K por aminación reductora.

La Figura 6 muestra el perfil de elución de HPLC-SEC-RI de PRP oxidado después del tratamiento con NaIO_4 .

5 La Figura 7 es un espectro de RMN de PRP oxidado. Esto confirma la formación de grupos aldehído sobre PRP después de la oxidación con peryodato.

10 La Figura 8 muestra espectros de CD de UV lejano que confirman que no hay diferencia en la estructura secundaria entre muestras de LTS61K y conjugadas de PRP-LTS61K; y también espectros de fluorescencia que confirman que no hay diferencia de la estructura terciaria máx $[\lambda]$ entre muestras de LTS61K y conjugadas de PRP-LTS61K.

15 La Figura 9 muestra análisis de aminoácidos que confirman la conjugación satisfactoria de PRP con LTS61K y la formación de un enlace covalente.

La Figura 10 muestra el análisis de transferencia Western por SDS-PAGE para confirmar la conjugación covalente entre PRP y LTS61K.

20 La Figura 11 muestra conjugados de PRP-LTS61K purificados analizados por IEF PAGE.

La Figura 12 muestra la transferencia Western IEF para confirmar la conjugación covalente entre PRP y LTS61K.

25 La Figura 13 confirma la pureza de la vacuna de conjugado purificada mediante HPLC-SEC-UV-MALLS-RI.

La Figura 14 muestra los conjugados de PRP-LTS61K purificados analizados por IEF PAGE para confirmar la pureza de la vacuna de conjugado purificada.

30 La Figura 15 resume un estudio de inmunogenicidad de rata de conjugados de PRP de Hib-LTS61 de la presente invención.

La Figura 16 resume un estudio de inmunogenicidad de conejo de conjugados de PRP de Hib-LTS61 K de la presente invención.

35 La Figura 17 ilustra los resultados de un estudio de inmunogenicidad de conejo de conjugados de PRP de Hib-LTS61K de la presente invención, resultados del ensayo de títulos bactericidas en sueros de conejo y títulos de Ab anti-IgG de PRP.

40 La Figura 18 ilustra información adicional sobre el estudio de inmunogenicidad de conejo.

La Figura 19 ilustra resultados de un estudio de inmunogenicidad de conejo de conjugados de PRP de Hib-LTS61K de la presente invención, resultados de los títulos bactericidas en sueros de conejo (BA) y títulos de Ab anti-IgG de PRP (DO).

45 La Figura 20 muestra resultados de ELISA de inmunogenicidad de conejo adicional de estudios de respuestas de anticuerpos anti-PRP y anti-LTS61K.

50 La Figura 21 muestra los resultados del ensayo bactericida en sueros de conejo adicional y Ab anti-IgG de PRP.

La Figura 22 muestra resultados de ensayo bactericida en sueros de conejo adicional y Ab anti-IgG de PRP después de una cuarta inmunización.

55 La Figura 23 muestra la inmunogenicidad en ratón sobre conjugados de PS de serotipo 14 neumocócico-LTS61K.

Descripción detallada de la invención:

60 Los presentes inventores han descubierto ahora que las vacunas de polisacárido-LTS61K conjugadas hechas según la presente invención inducen sorprendentemente mayores títulos de anticuerpos IgG específicos de polisacárido y mayor actividad bactericida en sueros que las de polisacárido o polisacárido mezclado con LTS61K.

Una lista de abreviaturas empleada en el presente documento es la siguiente:

65 CFU: unidad formadora de colonias
ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción

Hib: tipo *Haemophilus influenzae*
 bIEF: isoelectroenfoque
 LT: enterotoxina termolábil
 MALLS: dispersión de luz láser a múltiples ángulos
 DO: densidad óptica
 PNPS: polisacárido neumocócico
 PRP: polirribosil ribitol fosfato
 PS: polisacárido
 SDS-PAGE: electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida
 SEC_HPLC: cromatografía líquida de alta presión de exclusión de tamaño
 RI: índice de refracción

La nueva proteína transportadora empleada en los conjugados de la presente invención es el mutante de la enterotoxina termolábil de *E. coli* recombinante desintoxicada LTS61K. En el mutante de LT, las sub-unidades A y B forman una estructura de holotoxina AB5 típica. El mutante de LT desintoxicado (LTS61K) contiene una sub-unidad madura mutada A (LTA) que incluye K en la posición de aminoácido 61 y una sub-unidad B madura no mutada (LTB). LTS61K convierte el producto en significativamente menos tóxico que LT no mutante. La proteína transportadora se representa en la Figura 1 de los dibujos.

La invención de LTS61K se basa en el descubrimiento inesperado de que una LT que contiene una LTA mutada presenta toxicidad reducida en comparación con su homólogo no mutado mientras que retiene la inmunogenicidad. Esta LTA mutada tiene una sustitución de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 61 de una LTA no mutada, cuya secuencia de aminoácidos, SEC ID N°: 5, se muestra en las solicitudes de patente citadas. Por consiguiente, LTS61K caracteriza un polipéptido aislado que incluye una LTA mutada que contiene un residuo de aminoácido distinto de S, T y F en la posición correspondiente a la posición 61 de SEC ID N°: 5. El residuo de aminoácido de sustitución puede ser D, E, H, I, K, L, N, P, Q, R, Y o W. Puede ser un aminoácido que existe de forma natural o un aminoácido que existe de forma no natural, por ejemplo, un D-aminoácido o un [beta]-aminoácido. En un ejemplo, la LTA tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, 4, 8 o 10. Una LT que contiene esta LTA mutada presenta toxicidad reducida, es decir, $<10^{-5}$ veces la de una LT no mutada que contiene SEC ID N°: 5 en las solicitudes de patente anteriormente identificadas.

Según la presente invención, se cultivó *Haemophilus influenzae* tipo B y se purificó su antígeno de polisacárido capsular, polirribosil ribitol fosfato (PRP). El PRP es lineal, tiene una carga negativa y es hidrófilo. El sacárido de PRP de Hib con peso molecular 345 y fórmula 10C,18H,11O,1P se representa como en la Figura 2 de los dibujos.

PRP se conjuga sobre LTS61K por una reacción de aminación reductora química empleando relaciones molares apropiadas de polisacárido PRP con respecto a proteína (LTS61K) que producen vacunas de conjugado. Los intervalos de relaciones molares de PRP:LTS61K se muestran en la Tabla 1, a continuación. Preferentemente, el intervalo de relaciones molares de PRP:LTS61K está entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 60:1, y mol /mol de IO₄/PRP está entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4.

Tabla 1. Diferentes relaciones de la prueba de conjugación de PRP/LTS61K

PRP:LT S61K (w:w)	PRP:L T 61K (m:m)	IO ₄ /PRP Unidad repetida (m/m)	Promedio Unidad repetida PRP (Ensayo Colorimétrico)	Tiempo de reacción	PRP/ Proteína LTS61K (w/w)	PRP/ Proteína LTS61K (m/m)
0.5:1	3:1	0.1	42	2 semanas	0.059	0.68
1:1	6:1	0.1	42	2 semanas	0.099	1.14
1.5:1	9:1	0.1	42	2 semanas	0.13	1.5
2:1	28:1	0.2	17.5	2 semanas	0.21 (10/48)	3
3:1	42:1	0.2	17.5	2 semanas	0.23	3.2
4:1	56:1	0.2	17.5	2 semanas	0.24	3.4
3:1	42:1	0.2	17.5	3 semanas	0.21	2.9
3:1	42:1	0.2	17.5	4 semanas	0.35	4.9
3:1	42:1	0.2	17.5	5 semanas	0.33	4.6

	PRP:LT S61K (w:w)	PRP:L T 61K (m:m)	IO ₄ /PRP Unidad repetida (m/m)	Promedio Unidad repetida PRP (Ensayo Colorimétrico)	Tiempo de reacción	PRP/ Proteína LTS61K (w/w)	PRP/ Proteína LTS61K (m/m)
5	3:1	42:1	0.2	17.5	6 semanas	0.31	4.3
	3:1	50:1	0.3	14.2	2 semanas	0.34	5.8
10	3:1	60:1	0.4	12.2	2 semanas	0.37(10/27) 0.5(10/20)	7.4

15 Adicionalmente según la presente invención, una variedad de diferentes tipos de los antígenos de polisacárido capsular bacteriano de *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae* se conjugan químicamente con la proteína LTS61K por reacciones de aminación reductora. Se emplearon una variedad de diferentes relaciones molares de NaIO₄:PRP como se muestra en la Tabla 1, anteriormente, para oxidar polisacáridos para producir longitudes cortas de polisacáridos con diferentes unidades de repetición. Tras la apropiada relación molar del polisacárido reaccionado con LTS61K, se obtuvieron los productos de conjugado de polisacárido-LTS61K satisfactoriamente conjugados y purificados. Los productos estuvieron en forma soluble y se evaluaron física y químicamente por SEC-HPLC, orcinol, SDS-PAGE, transferencia Western, IEF, actividad de unión a GM1, dicroísmo circular y ensayos fluorescentes para identificar la satisfactoria conjugación química del antígeno de polisacárido y la proteína transportadora LTS61K.

25 Ejemplo del procedimiento de preparación de polisacárido conjugado con LTS61K:

Se ilustra una variedad de posibles procesos de conjugación en la Figura 3 de los dibujos. Un diagrama de flujo generalizado del proceso de aminación reductora seleccionada según la presente invención se encuentra en Glyconjugate J. 1989,6:489 y se reproduce como la Figura 4 de los dibujos.

30 Según la presente invención, se escinde un polisacárido por oxidación con peryodato a fragmentos más pequeños para producir grupos terminales de aldehído. A partir de aquí, la conjugación del polisacárido oxidado con la proteína LTS61K se lleva a cabo por aminación reductora. Más específicamente, un ejemplo del proceso es el siguiente:

35 A. Activación de polisacárido (oxidación con peryodato): Se mezcla polirribosil ribitol fosfato nativo (PRP), que es polisacárido capsular purificado de *Haemophilus influenzae* tipo b, en una cantidad de 5 mg/ml con peryodato (IO₄) 0,3 o 0,6 o 1,2 mg/ml (relación molar (m/m) de IO₄ con respecto a PRP = 0,1, 0,2, 0,4). Esta mezcla se dejó reposar a 4 °C en la oscuridad durante 24 horas. A continuación se añadió glicerol para terminar la reacción. El PRP oxidado resultante se sometió a diálisis contra ddH₂O usando membrana de 3,5 K para eliminar las impurezas. El producto resultante se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 μm. El procedimiento de oxidación con peryodato proporcionó la fragmentación del polisacárido PRP en diferentes longitudes de cadena. El intervalo del número promedio de unidades de repetición de PRP fue aproximadamente 40 a 10.

45 B. Conjugación de polisacárido-LTS61K: Preparación del conjugado de PRP y LTS61K, mezcla de PRP oxidado obtenido de antes, LTS61K purificado (que se desveló en las patentes obtenidas previas/presentadas) y cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN), en 10 mg/ml, 3 mg/ml y 10 mg/ml, respectivamente, la reacción se llevó a cabo durante 2 semanas a 4 °C en la oscuridad. La reacción se terminó añadiendo borohidruro de sodio NaBH₄ para extinguir los aldehídos sin reaccionar sobre PRP, la preparación se dializó entonces contra ddH₂O con membrana de 10 K.

50 C. Caracterización de los productos de LTS61K conjugados con polisacárido: Tras la apropiada relación molar del polisacárido reaccionado con LTS61K, se obtuvieron los productos del conjugado de polisacárido-LTS61K satisfactoriamente conjugados y purificados. Los productos con forma soluble se evaluaron física, química y biológicamente por SEC-HPLC, orcinol, SDS-PAGE, transferencia Western, IEF, actividad de unión a GM1, dicroísmo circular y ensayos fluorescentes para confirmar la conjugación química satisfactoria del antígeno de polisacárido y la proteína transportadora LTS61K, relación de polisacárido con respecto a la proteína LTS61K, y su inmunogenicidad. La Figura 5 de los dibujos resume las condiciones de reacción y ensayos empleados según ejemplificación específica de la presente invención.

60 Ahora se hace referencia a las figuras de dibujos que se refieren a la confirmación de estructura y pureza de los conjugados y vacuna.

La Figura 6 muestra el perfil de elución de HPLC-SEC-RI de PRP oxidado después del tratamiento con NaIO₄. Esta figura ilustra el proceso de la invención y los resultados son fácilmente reproducibles.

65 La Figura 7 es un espectro de RMN de PRP oxidado. Esto confirma la formación de grupos aldehído sobre PRP

después de la oxidación con peryodato.

La Figura 8 muestra espectros de CD de UV lejano que confirman que no hay diferencia en la estructura secundaria entre muestras de LTS61K y conjugadas de PRP-LTS61K; y también espectros de fluorescencia que confirman que no hay diferencia de la estructura terciaria máx λ entre muestras de LTS61K y conjugadas de PRP-LTS61K.

La Figura 9 muestra análisis de aminoácidos que confirman la conjugación satisfactoria de PRP con LTS61K y la formación de un enlace covalente.

La Figura 10 muestra el análisis de transferencia Western por SDS-PAGE para confirmar la conjugación covalente entre PRP y LTS61K.

La Figura 11 muestra conjugados de PRP-LTS61K purificados analizados por IEF PAGE.

La Figura 12 muestra la transferencia Western IEF para confirmar la conjugación covalente entre PRP y LTS61K.

La Figura 13 confirma la pureza de la vacuna de conjugado purificada mediante HPLC-SEC-UV-MALLS-RI.

La Figura 14 muestra los conjugados de PRP-LTS61K purificados analizados por IEF PAGE para confirmar la pureza de la vacuna de conjugado purificada.

La Tabla 2, a continuación, es el resultado de un ensayo de unión a GM1 que confirma que la proteína LTS61K retuvo su actividad de unión tras la conjugación.

Tabla 2

	0.2/2w PRP-LTS61K conjugado	0.2/4w PRP-LTS61K conjugado	0.4/2w PRP-LTS61K conjugado	0.4/4w PRP-LTS61K conjugado
GM1-actividad de unión(unidad=M)	5.19 x 10 ⁻¹⁰	4.77 x 10 ⁻¹⁰	4.23 x 10 ⁻¹⁰	2.79 x 10 ⁻¹⁰

Estudios preclínicos en mamífero que muestran la eficacia de los conjugados de polisacárido-LTS61K:

Se inmunizaron intramuscularmente tres veces, a intervalos de dos semanas, conejos blancos de Nueva Zelanda usando la dosis humana prevista del polisacárido, polisacárido mezclado con LTS61K o conjugado de polisacárido-LTS61K para evaluar la potencia de las vacunas de conjugado. Ninguna de las preparaciones de vacuna contuvo AIPO4 u otro adyuvante relacionado. Las respuestas inmunitarias de todas las vacunas se determinaron por ELISA para detectar títulos de anti-IgG específica de antígeno de polisacárido y ensayo bactericida en sueros para detectar la actividad funcional de los anticuerpos. Los resultados del estudio indicaron que solo vacunas de polisacárido-LTS61K satisfactoriamente conjugadas pudieron inducir mayores títulos de anticuerpos IgG específicos de polisacárido y mayor actividad bactericida en sueros que el polisacárido solo, o polisacárido mezclado con LTS61K solo. Los estudios de inmunogenicidad animal sugieren que la holotoxina de enterotoxina termolábil de *E. coli* desintoxicada que incluye la proteína LTS61K es útil como proteína transportadora de polisacárido para estimular significativamente una respuesta inmunitaria específica de antígenos de polisacárido.

Ahora se hace referencia a figuras adicionales de dibujos que se refieren a los resultados de los estudios en mamífero iniciales.

La Figura 15 resume un estudio de inmunogenicidad de rata de conjugados de PRP de Hib-LTS61K de la presente invención.

La Figura 16 resume un estudio de inmunogenicidad de conejo de conjugados de PRP de Hib-LTS61K de la presente invención.

La Figura 17 ilustra los resultados de un estudio de inmunogenicidad de conejo de conjugados de PRP de Hib-LTS61K de la presente invención, resultados del ensayo de títulos bactericidas en sueros de conejo y títulos de Ab anti-IgG de PRP. Solo los conjugados de PRP-LTS61K fueron capaces de inducir títulos de Ab anti-IgG de PRP. La LTS61K añadida adicional en los conjugados de PRP-LTS61K no potenció los Ab anti-IgG de PRP.

La Figura 18 ilustra información adicional sobre el estudio de inmunogenicidad de conejo.

La Figura 19 ilustra resultados de un estudio de inmunogenicidad de conejo de conjugados de PRP de Hib-LTS61K de la presente invención, resultados de los títulos bactericidas en sueros de conejo (BA) y títulos de Ab anti-IgG de PRP (DO).

Se realizaron estudios adicionales empleando los procedimientos y observando los resultados expuestos a continuación:

5 Se inmunizaron intramuscularmente tres veces y cuatro veces, a intervalos de dos semanas, conejos blancos de Nueva Zelanda usando la dosis humana prevista del polisacárido, polisacárido mezclado con LTS61K y conjugado de polisacárido-LTS61K para evaluar la potencia de las vacunas de conjugado. Ninguna de las preparaciones contuvo AlPO_4 u otro adyuvante relacionado. Las respuestas inmunitarias de todas las vacunas se determinaron por ELISA para detectar títulos de anti-IgG específica de antígeno de polisacárido y ensayo bactericida en sueros para mostrar la actividad funcional de los anticuerpos anti-polisacárido. También se determinaron por ELISA las respuestas de títulos de anti-IgG de LTS61K en suero y se usaron la inducción por AMPc de células Caco-2 *in vitro* y el estudio de redondeo de la toxicidad de células suprarrenales Y-1 para determinar la capacidad neutralizante de Ab anti-LTS61K en suero con LT no mutante. Se realizaron estudios *in vivo* de exposición al asa ileal de conejo para examinar la función de los anticuerpos anti-LTS61K. Los estudios de inmunogenicidad en animal sugieren que la holotoxina de enterotoxina termolábil de *E. coli* desintoxicada que incluye proteína LTS61K es útil como proteína transportadora de polisacárido para estimular significativamente una respuesta específica de antígenos de polisacárido. LTS61K, ella misma, puede usarse como inmunogén, y, produce eficazmente anticuerpos contra LT no mutante.

20 A. Estudios de inmunogenicidad de conejo. Inmunización de conejo intramuscular usando 10 ug de dosis de PRP, con artículos de prueba que incluyen: PRP, PRP conjugado con LTS61K y PRP mezclado con LTS61K; se administraron dos y tres refuerzos a intervalos bisemanales. Se recogieron muestras de sangre 14 días después de cada inmunización, y las muestras de suero recogidas se almacenaron a -80°C hasta uso.

25 B. Anticuerpos anti-polisacárido y anti-LTS61K determinados por ELISA. Se recubrió conjugado de PRP-BSA sobre la placa de 96 pocillos en la concentración de PRP a 100 ng/pocillo para la determinación de anticuerpos anti-PRP, y se recubrieron con LTS61K a 250 ng/pocillo para la determinación de anticuerpos anti-LTS61K. Las placas recubiertas se incubaron durante 16 horas a 4°C , y a continuación se incubaron con 5% de leche desnatada como tampón de bloqueo durante una hora a 37°C . Los sueros de los animales se probaron a partir de una dilución de 1:50. Se midieron anticuerpos específicos usando una IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante incubada durante 1 hora a 37°C , y los anticuerpos se revelaron añadiendo sustrato de TMB (tetrametilbencidina)-peroxidasa, y después de 10 minutos, la reacción se terminó mediante la adición de 12% de H_2SO_4 y la absorbancia se leyó a DO (densidad óptica) 650-450 nm (longitud de onda de referencia 650 nm). Los títulos de ELISA se expresaron como la inversa de la última dilución que dio $\text{DO } 450 \geq 0,5$.

35 C. Ensayo bactericida en sueros. Se realizó la actividad bactericida mediada por el complemento dependiente de anticuerpo para los títulos diluidos de suero que destruyeron más del 50% de las colonias de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). Se pretrataron muestras de suero a 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento de suero de conejo. Se prepararon diluciones sucesivas dobles de las muestras de suero con volumen de 10 ul en placas de fondo en U de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 20 ul del cultivo de Hib diluido que se preparó en 1000 UFC/20 ul. Las mezclas se incubaron adicionalmente a 37°C con 5% de CO_2 durante 15 minutos, y se añadieron 50 ul de 1:1 de complemento de conejo bebé diluido en tampón de Hanks a cada pocillo, y la mezcla se incubó a 37°C con 5% de CO_2 durante 60 minutos. Se sembraron 5 ul de la mezcla añadida con complemento de conejo bebé en las placas de agar de chocolate, y las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 durante 16 horas. Se contaron las unidades formadoras de colonias de Hib y se determinaron los títulos de dilución de sueros que destruyeron más del 50% de las colonias de Hib. Todas las muestras de suero se comparan con el número recíproco de títulos de dilución en gráficas.

50 D. Se realizó inducción del estudio de AMPc en células Caco-2 por LT no mutante neutralizada con anticuerpo anti-suero de LTS61K de conejo, usando un kit EIA de AMP cíclico (AMPc) (Enzo Life Science). Se incubaron diez nanogramos de LT no mutante con 150 ul de anti-suero de conejo de LTS61K (dilución 1:100) a temperatura ambiente. Después de una hora de incubación, la mezcla se añadió a la placa de células Caco-2 (5×10^4 célula/pocillo) y las células Caco-2 se incubaron adicionalmente a 37°C con 5% de CO_2 durante 2 horas. A continuación, las células se lavaron con PBS y se lisaron con HCl 0,1 M (200 ul por pocillo), y se neutralizaron con NaOH 0,1 M. Los productos de la lisis celular se recogieron por centrifugación a $660 \times g$ durante 10 min a temperatura ambiente. Las suspensiones resultantes se ensayaron para niveles de AMPc intracelular utilizando el kit de EIA comercial.

60 E. Se examinó el estudio de neutralización de LT no mutante con diluciones importantes de anti-suero de LTS61K de conejo sobre células de tumor suprarrenal de ratón Y-1. Para el ensayo de células Y-1, se premezclaron diluciones dobles sucesivas de sueros de conejo 50X, 100X a 102, 400X con LT no mutante 10^{-5} ug (que es la CE50, que es la concentración de toxina de LT no mutante para producir más del 50% de redondeo de células sobre células suprarrenales Y-1), tras la mezcla se añadieron a célula suprarrenal Y-1, 5×10^4 células/pocillo. Las células se observaron para cambios morfológicos (redondeo de células) después de 24 horas de incubación.

65 F. Estudio de acumulación de fluido en el asa ileal de conejo: La neutralización del anticuerpo de conejo anti-suero de LTS61K contra la LT no mutante se realizó en el ensayo de asa ileal de conejo. Se hicieron asas ileales de conejo

con segmentos de 5,5 cm sobre los conejos después de ser inmunizados con PRP o PRP conjugado con LTS61K o PRP mezclado con LTS61K. Se administraron LT no mutantes en los intervalos de concentración de 0,01 a 1 ug a cada animal del estudio; la cantidad de fluido acumulado en cada segmento se midió después de 18 horas.

- 5 Resultados del efecto de inmunogenicidad del polisacárido conjugado con LTS61K: estudios preclínicos en mamífero que muestran la eficacia de los conjugados de polisacárido-LTS61K

Los resultados del estudio se describen a continuación con referencia a las Figuras 20 a 23 de los dibujos y las Tablas 3 a 5.

- 10 Se determinaron anticuerpos para PRP y para LTS61K por ELISA. Los resultados de inmunogenicidad en conejos se mostraron en la Figura 20; solo los conejos administrados con tres inyecciones de conjugados de PRP-LTS61K provocan altos títulos de anticuerpos anti-IgG de PRP y fueron 1000 veces superiores a PRP o PRP mezclado con LTS61K. La principal inmunoglobulina inducida por la vacuna de conjugado de PRP-LTS61K fue IgG. La presencia de alto título de anticuerpo anti-IgG de LTS61K no interfirió con la respuesta inmunitaria de Ab anti-IgG de PRP.

- 15 En la Figura 20, que muestra el ELISA de inmunogenicidad de conejo de los resultados de las respuestas de anticuerpos anti-PRP y anti-LTS61K, todos los animales recibieron un total de tres dosis intramusculares cada una de 10 ug de PRP conjugado a intervalos de 2 semanas. Se recogieron sueros y se ensayaron una semana después de la dosis 1 (1WPD1), una semana después de la dosis 2 (1WPD2) y dos semanas después de la dosis 3 (2WPD3) como se representa en la Figura 20.

- 20 El potencial protector de los anticuerpos anti-PRP inducido por los conjugados se evaluó probando la actividad bactericida de los sueros de conejo. Los títulos bactericidas se determinaron contra la cepa Eagen de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), los datos se presentaron como la inversa de la dilución del suero que destruyó más del 50% de las colonias de Hib. La Figura 21 muestra que los conejos después de inmunización intramuscular de tres veces, a intervalos de dos semanas, en PRP 10 ug por dosis, los títulos de Ab anti-IgG de PRP y bactericidas fueron similares en los tres lotes de conjugados de PRP-LTS61K preparados internamente, con las unidades de repetición promedio de PRP conjugado en 40 o 10, y las dosis de conjugados de PRP-LTS61K 10 ug/48 ug a 10 ug/30 ug por dosis. Mientras tanto, PRP y PRP mezclado con sueros de conejos inmunizados con LTS61K fueron incapaces de destruir Hib bacteriano, cuyos títulos recíprocos <2, y tampoco pudieron provocar anticuerpos anti-IgG de PRP. Solo los conjugados de PRP-LTS61K satisfactorios tienen un efecto bactericida con los altos títulos de anticuerpos anti-PRP.

- 25 La Figura 21 muestra el ensayo bactericida en sueros de conejo y respuestas de anticuerpos anti-IgG de PRP después de que los conejos recibieran tres dosis intramusculares cada uno de 10 ug de PRP conjugado a intervalos de 2 semanas. Los sueros probados se recogieron en el día 43, dos semanas después de la dosis 3.

- 30 Se realizó un estudio de refuerzo en conejos después de recibir una inmunización triple primaria de los conjugados de PRP-LTS61K. Los resultados se resumen en la Figura 22, que demostraron que los títulos bactericidas y los títulos de anticuerpos anti-IgG de PRP disminuyeron gradualmente con el tiempo, aunque 6WPD3 (6 semanas después de la dosis 3) los títulos bactericidas en sueros de conejo fueron más bajos que en los sueros de conejo 2WPD3, los anticuerpos de conejo anti-IgG de PRP de sueros y los títulos bactericidas pudieron potenciarse eficazmente después de una dosis posterior de conjugados de PRP-LTS61K. Sin embargo, estos fenómenos no pudieron observarse en PRP o PRP mezclado con conejos inmunizados con LTS61K.

- 35 Con respecto a la Figura 22, los conejos se inmunizaron con diferentes relaciones de conjugados de PRP-LTS61K. Se obtuvieron sueros en diferentes momentos, y se realizaron ensayos de Ab anti-IgG de PRP de ELISA y bactericidas. Los resultados demuestran correlaciones entre los anticuerpos anti-IgG de PRP de suero y las actividades bactericidas en suero, y que una 4ª inmunización en conejos con conjugados de PRP-LTS61K refuerza eficazmente los Ab anti-PRP.

- 40 La Tabla 3 muestra que la toxina LT no mutante a 10 ng fue incapaz de estimular un aumento de la liberación intracelular de los niveles de AMPc en células Caco-2, solo cuando los sueros de conejo con altos anticuerpos anti-LTS61K; aquellos fueron conjugados de PRP-LTS61K y PRP mezclado con sueros de conejos inmunizados con LTS61K. A diferencia, los sueros de conejo obtenidos de conejos inmunizados con PRP no previnieron que LT no mutante aumentara los niveles de AMPc en células Caco-2.

60

65

Tabla 3: Inducción del estudio de AMPc en células Caco-2 por LT no mutante neutralizada con anticuerpo de conejo anti-suero de LTS61K.

Muestras	Conejo inmunizado PRP/LTS61K (ug/ug)	cAMP (pmol/mL)
PRP-LTS61K conjugado	10/45	3.36
PRP-LTS61K conjugado	10/53	2.68
PRP mezclado con LTS61K	10+45	3.31
PRP	10	19.1
Control positivo wt LT 10 ng	-	30.89
Control negativo PBS	-	3.09

Se realizó un estudio de neutralización de LT no mutante con diluciones sucesivas de conejo anti-suero de LTS61K en células tumorales suprarrenales de ratón Y-1. Los resultados en la Tabla 4 demuestran que solo aquellos sueros de conejo presentes con los anticuerpos anti-LTS61K neutralizan eficazmente la toxicidad de LT no mutante, que se produjo en conjugados de PRP-LT61K y PRP mezclado con sueros de conejos inmunizados con LTS61K, pero no en sueros de conejos inmunizados con PRP.

Tabla 4: Estudio de neutralización

Muestras	Conejo inmunizado PRP/LTS61K (ug/ug)	título Y-1 neutralización célula adrenal
PRP-LTS61K conjugado	10/45	3200 X
PRP-LTS61K conjugado	10/53	3200 X
PRP mezclado con LTS61K	10+45	3200 X

Los datos en la Tabla 5 muestran que a la concentración de 0,01 ug por segmento de 5,5 cm del asa ileal la acumulación de fluido de LT no mutante se indujo en el conejo sin anticuerpos anti-LTS61K; sin embargo, en el conejo con anticuerpos anti-LTS61K, no hubo acumulación de fluido. Estos resultados confirman aquellos previamente obtenidos de la inducción por AMPc de Caco-2 *in vitro* y estudios de neutralización de células suprarrenales Y-1, que los anticuerpos anti-LTS61K del suero pueden neutralizar LT no mutante. Se observaron lesiones hemorrágicas graves en la mucosa del íleon en el conejo sin Ab anti-LTS61K administrado con LT no mutante en 0,5 y 1,0 ug por segmento.

Tabla 5: Estudio de acumulación de fluido en el asa ileal de conejo.

Dosis LT Tipo salvaje (ug/segmento)	Conejo sin anti-LTS61K Ab		Conejo Nº 1 con anti-LTS61K Ab		Conejo Nº 2 con anti-LT Ab	
	Acumulación de fluido (mL/segmento)*	Lesiones en mucosa del íleon**	Acumulación de fluido (mL/segmento)	Lesiones en mucosa del íleon	Acumulación de fluido (mL/segmento)	Lesiones en mucosa del íleon
0	0.0	-	0.0	-	0.0	-
0.01	4.95	-	0.0	-	0.0	-
0.1	8.8	+	0.0	-	4.4	-
0.5	10.45	++	No finalizada	No finalizada	11.0	-
1	12.1	+++	11.0	+	11.0	-

* La acumulación de líquido se mide en cada segmento de 5,5 cm del asa ileal de conejo.

** Lesiones hemorrágicas severas en la mucosa del íleon se observaron en el conejo sin anti-LTS61K Ab administrando LT tipo salvaje en dosis de 0,5 y 1,0 ug por segmento.

Los resultados de un estudio de inmunogenicidad de animal como un ejemplo de serotipo 14 de polisacárido neumocócico conjugado covalentemente con LTS61K se muestran en la Figura 23. Los títulos de anticuerpos para PNPS serotipo 14 se determinaron por ELISA. Las muestras fueron conjugados de PNPS 14-LTS61K con unidades de repetición promedio de PS de 94 o 40, PNPS 14 solo, PNPS 14 mezclado con LTS61K, y PBS. Solo los productos conjugados fueron capaces de inducir altos anticuerpos anti-IgG de PNPS 14. La presencia del adyuvante químico, hidróxido de aluminio, durante el programa de inmunización no benefició o mejoró significativamente los anticuerpos anti-PNPS 14.

La Figura 23 muestra la inmunogenicidad en ratones en conjugados de PS neumocócico serotipo 14-LTS61K. Solo los animales administrados con conjugados de PNPS 14-LTS61K provocan altos títulos de anticuerpos anti-IgG de PS y fueron 500 veces superiores a PNPS 14 o PNPS14 mezclado con LTS61K.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Reivindicaciones

- 5 1. Un conjugado covalente de un polisacárido y una enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli* desintoxicada, en el que la LT es una holotoxina y es una proteína mutante LTS61K que tiene una sustitución de lisina en la posición correspondiente a la posición 61 de SEC ID N°: 5.
2. El conjugado covalente de la reivindicación 1, en el que el polisacárido es polirribosil ribitol fosfato (PRP).
- 10 3. Una vacuna que comprende un conjugado covalente purificado de la reivindicación 1 o 2.
4. Uso de un conjugado covalente purificado de la reivindicación 1 o 2 en la fabricación de un medicamento para proteger o inmunizar mamíferos de los efectos de bacterias infecciosas.
- 15 5. Un método de preparación de un conjugado covalente de la reivindicación 1 o 2 que comprende oxidación con peryodato del polisacárido, seguido de aminación reductora del polisacárido resultante y la proteína mutante LTS61K, y aislamiento del conjugado resultante.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el polisacárido es PRP.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, en el que el intervalo de relaciones molares de PRP:LT está entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 60:1.
8. Uso de un conjugado covalente purificado de la reivindicación 1 o 2 en la fabricación de un medicamento para proteger o inmunizar mamíferos de los efectos de la diarrea del viajero.
- 25 9. Uso de un conjugado covalente purificado de la reivindicación 1 o 2 en la fabricación de un medicamento para proteger o inmunizar mamíferos de los efectos de la diarrea de *E. coli* enterotoxigénica.
- 30 10. Uso de un conjugado covalente purificado de la reivindicación 1 o 2 en la fabricación de un medicamento para proteger o inmunizar mamíferos de la infección de *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Proteína transportadora LT

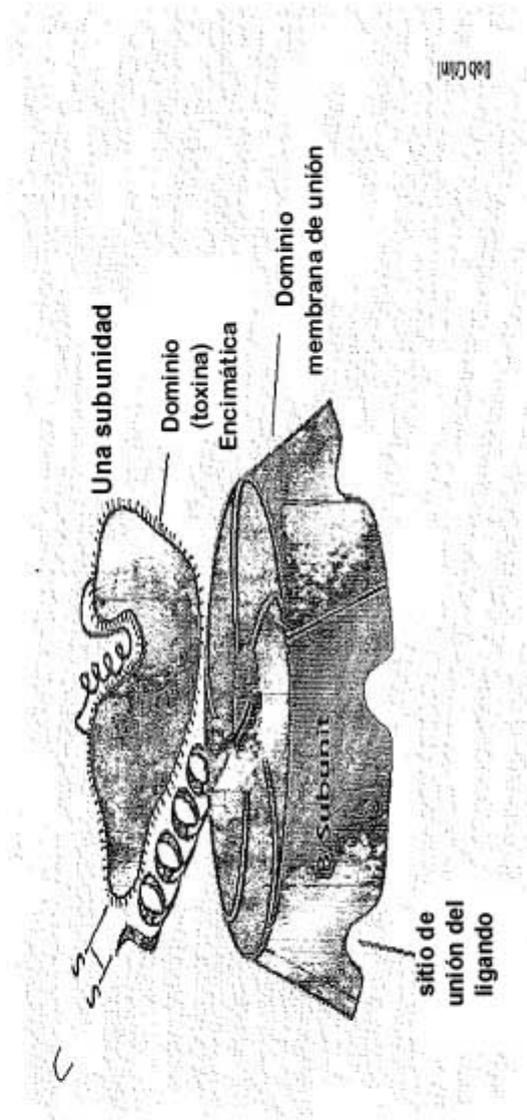
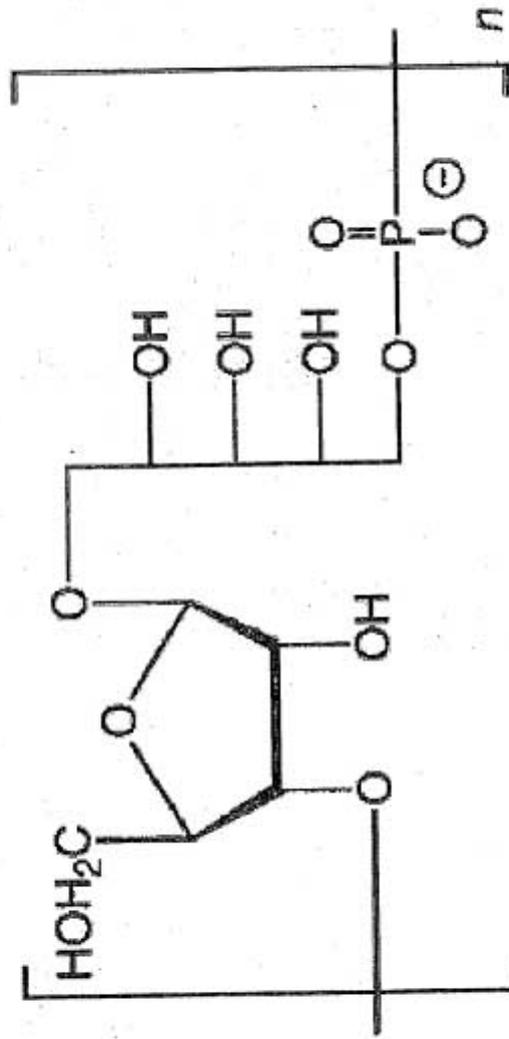


Figura 1

Sacáridos Hib PRP



→3-D-Ribf β 1 → 1-D-Ribitol5 → OPO3 →

Figura 2

Metodos de Conjugación

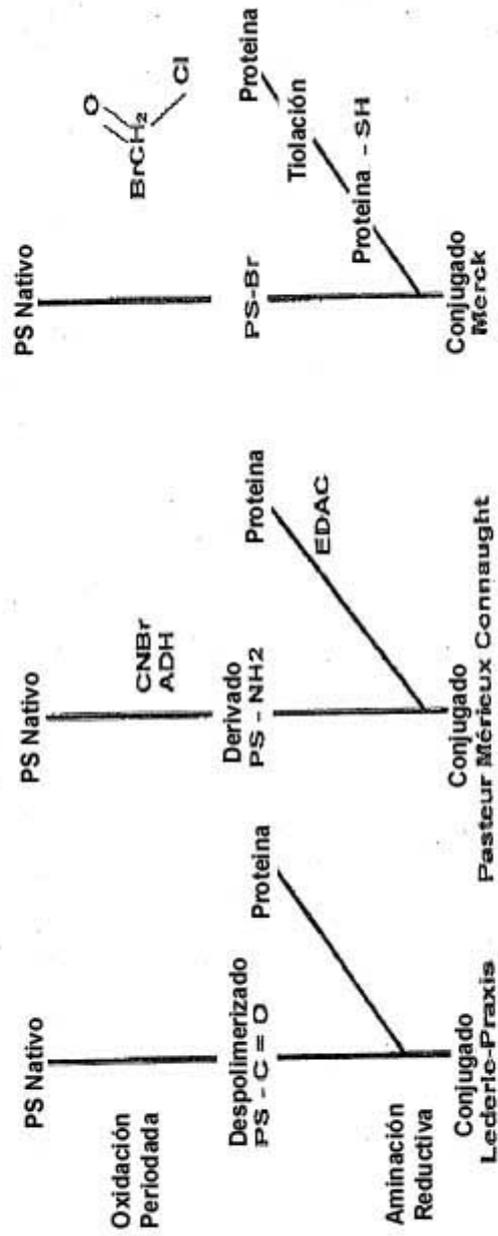


Figura 3

Aminación reductiva

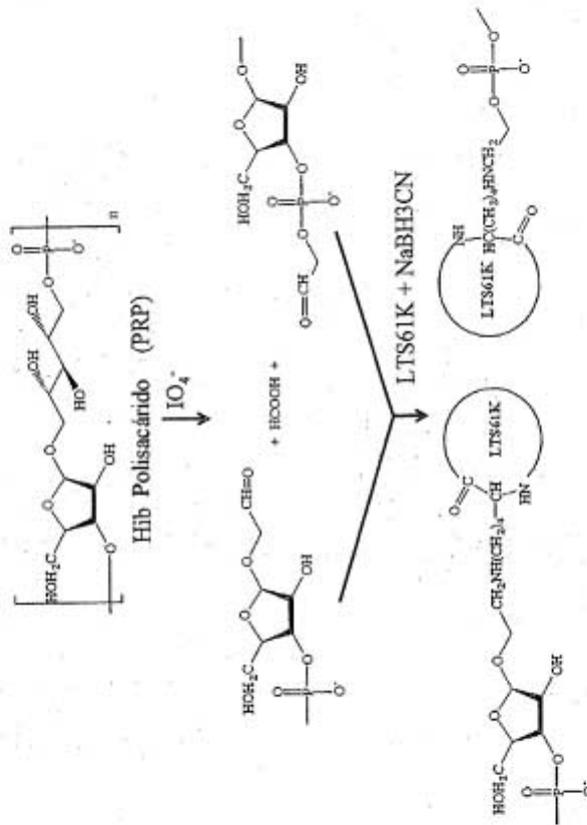


Figura 4

PRP, conjugación LTS61K por reducción de aminación

Ensayo

Condiciones reacción

Activación PS (oxidación periodato)

- Mix PRP (5 mg/ml) & periodato (0.3, 0.6, 1.2 mg/ml)
- (10⁻⁴/PRP unidad repetida 0.1, 0.2, 0.4 (ml/ml))
- Reacción 24 hr, 4°C, evitar luz
- Añadir glicerol a reacción terminal
- Diálisis (3.5K membrana) contra ddH₂O
- Filtración estéril (0.22 um)

Mw distribución por HPLC-SEC

- Mw distribución por SEC-HPLC
- Contenido ribosa por ensayo orcinol
- Contenido grupo reducido por ensayo BCA, ensayo Park & Johnson
- Identidad por NMR

PS-LT conjugación

- PRP, LT & NaBH₃CN (10, 3, 10 mg/ml), la mezcla PS/proteína en 1M de buffer de fosfato de sodio, fue añadido a una final de 0.2M fuerza iónica, y ph 7.5, despues sodio cianobromhidrido fue añadido
- Reacción a 4°C, 2 semanas
- Añadir borohidrido de sodio NaBH₄ para aplacar aldehidos no reaccionados
- Diálisis

- Distribución de conjugados (forma nativa) por SEC-HPLC
- Patrón conjugados por PAGE con PAS (ácido periódico de schiffs) mancha azul comasie
- Cambios pi conjugados por IEF
- Mancha oeste PAGE & IEF
- 30K MWCO purificación

Figura 5

HPLC-SEC-RI perfil de elución de PRP-oxidizado tras tratamiento-IO₄

$$IO_4^-/PRP \text{ (m/m)} = 0.04 \quad 0.1 \quad 0.2 \quad 0.4$$

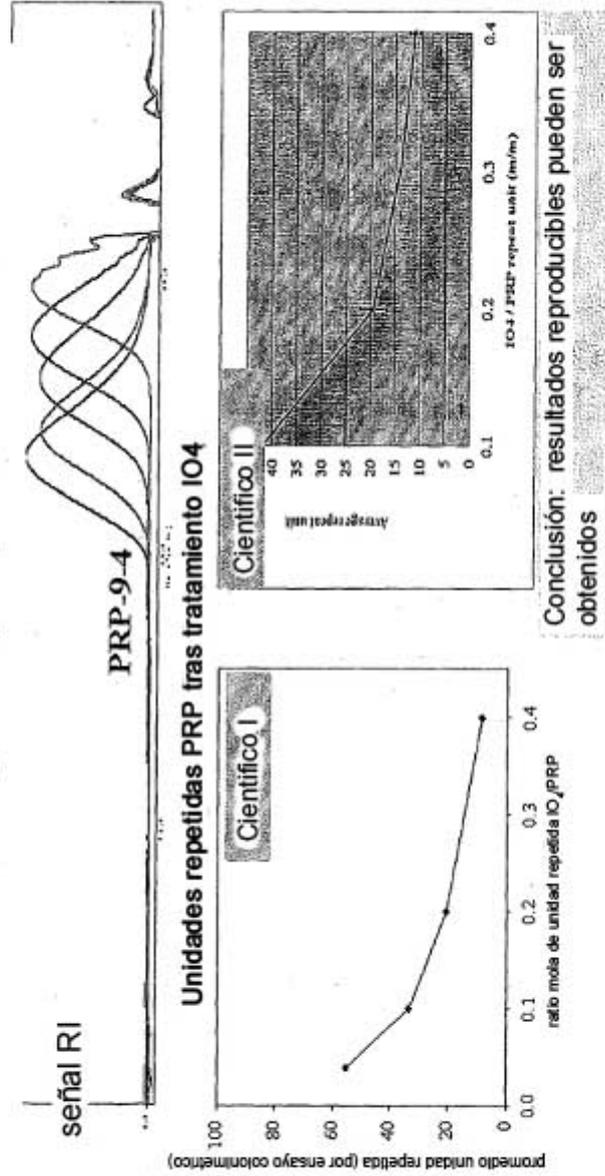


Figura 6

NMR espectro de PRP-oxidizado

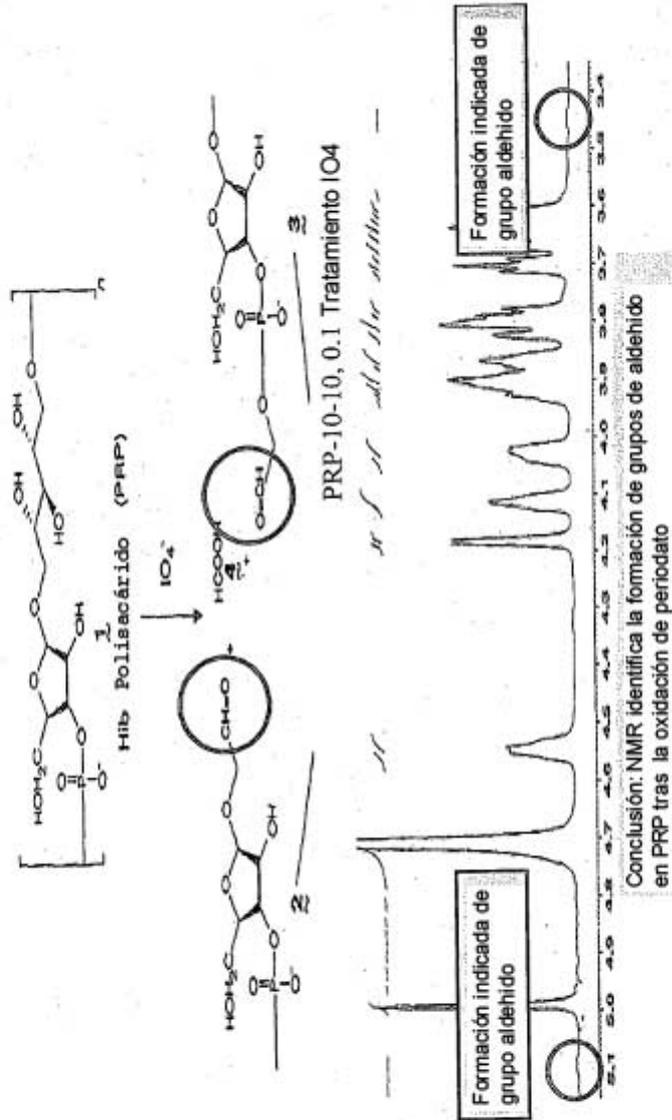


Figura 7

Far-UV CD Spectra y Fluorescencia Spectra de LTS61K & PRP-LTS61K Conjugados para confirmar la consistente estructura del conjugado

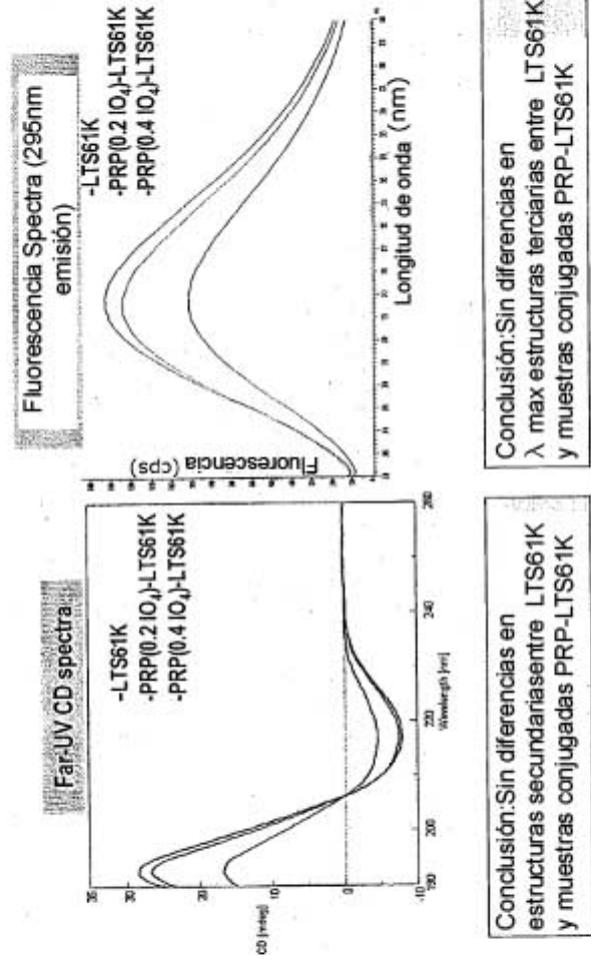


Figura 8

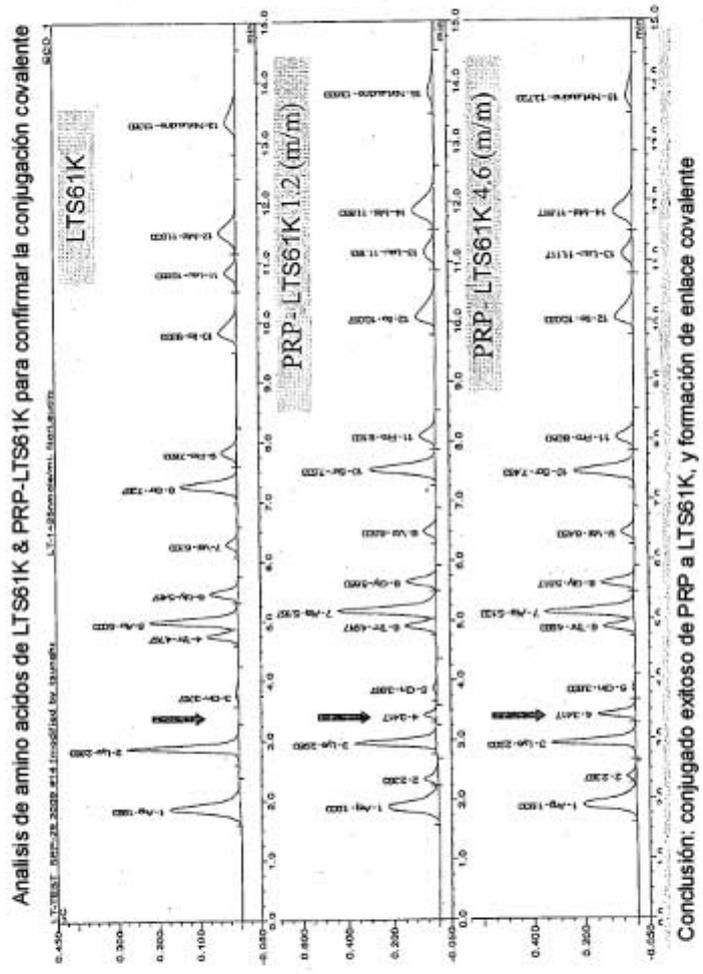


Figura 9

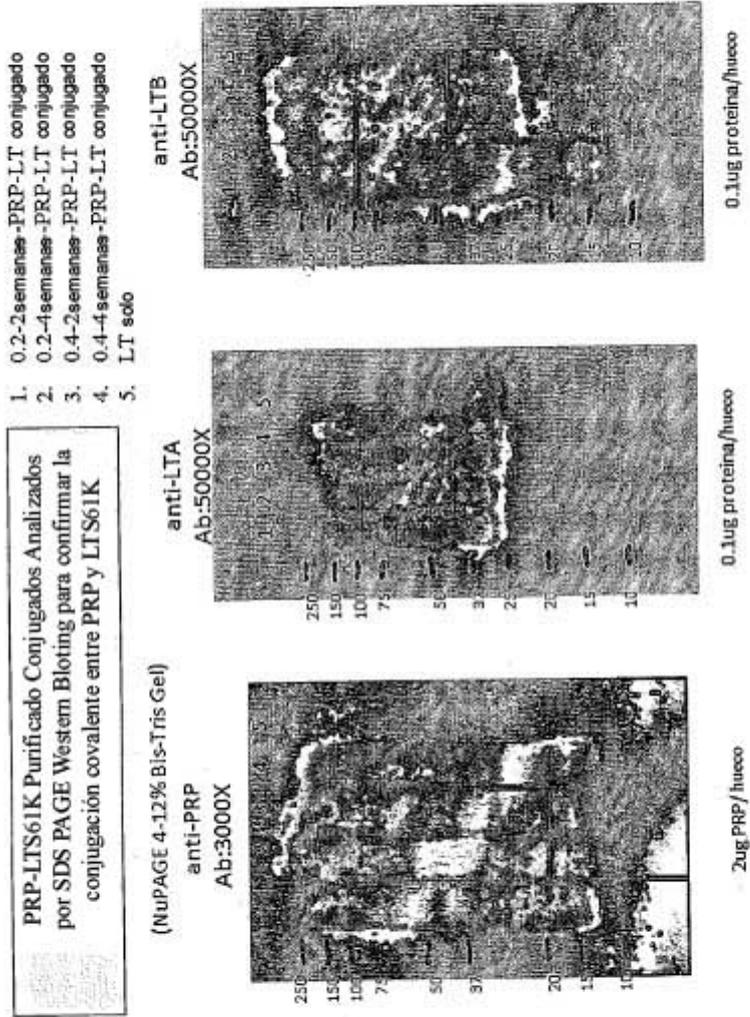


Figura 10

PRP-LTS61K Purificado Conjugados Analizados
por IEF PAGE

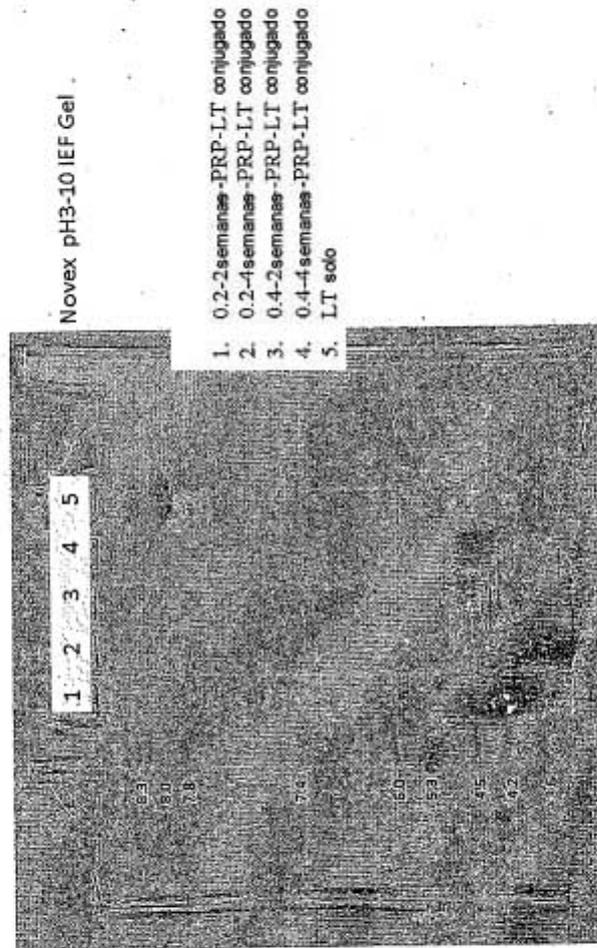


Figura 11

IEF Western Blotting para confirmar la conjugación covalente entre PRP y LTS61K

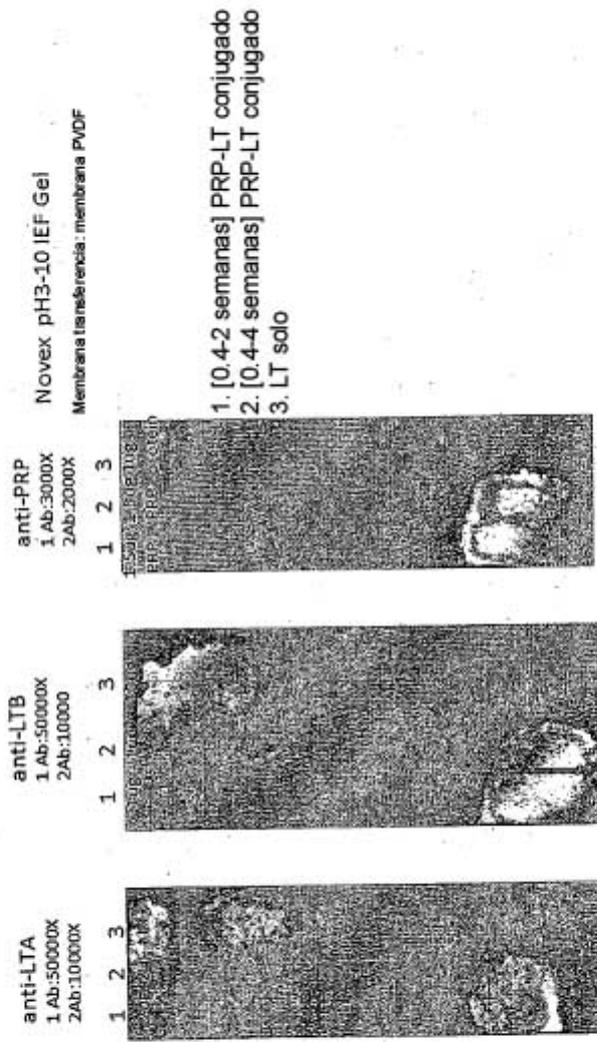


Figura 12

HPLC-SEC-UV-MALLS-RI para confirmar la pureza de la vacuna purificada conjugada

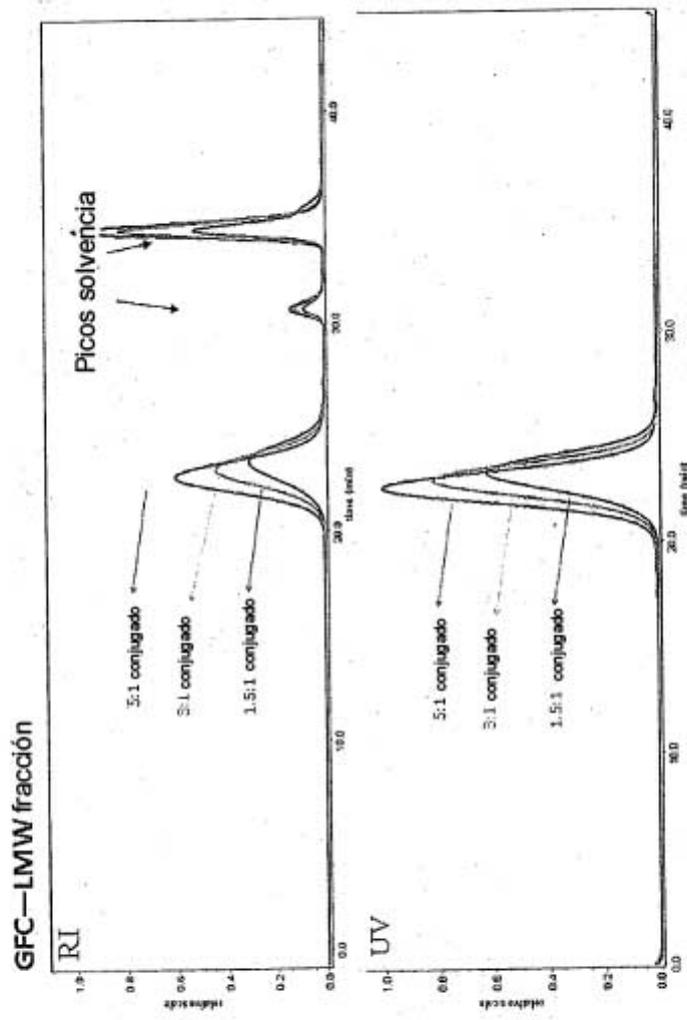


Figura 13

PRP-LTS61K Purificado conjugados analizados por IEF PAGE para confirmar la pureza de la vacuna conjugada purificada

(pH 3-10 IEF PAGE)

1. LT solo
2. 1.5:1 conjugado LMW
3. 3:1 conjugado LMW
4. 5:1 conjugado LMW
5. 10:1 conjugado
6. 1.5:1 conjugado HMW
7. 3:1 conjugado HMW
8. 5:1 conjugado HMW

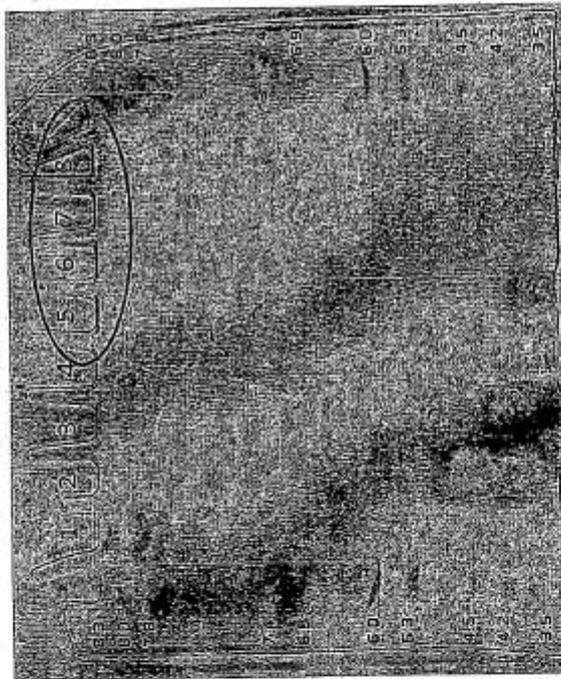


Figura 14

Estudio de Inmunogenicidad en ratas con conjugados Hib PRP-LTSK61K

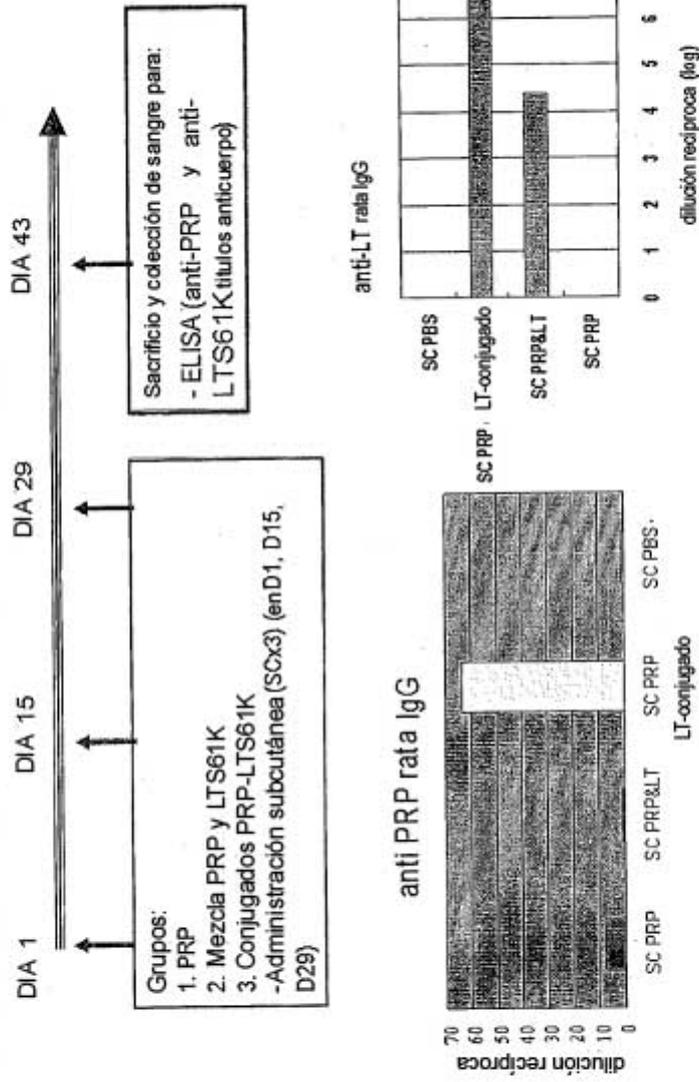


Figura 15

Estudio de inmunogenicidad en conejos de conjugados Hib PRP-LTS61K

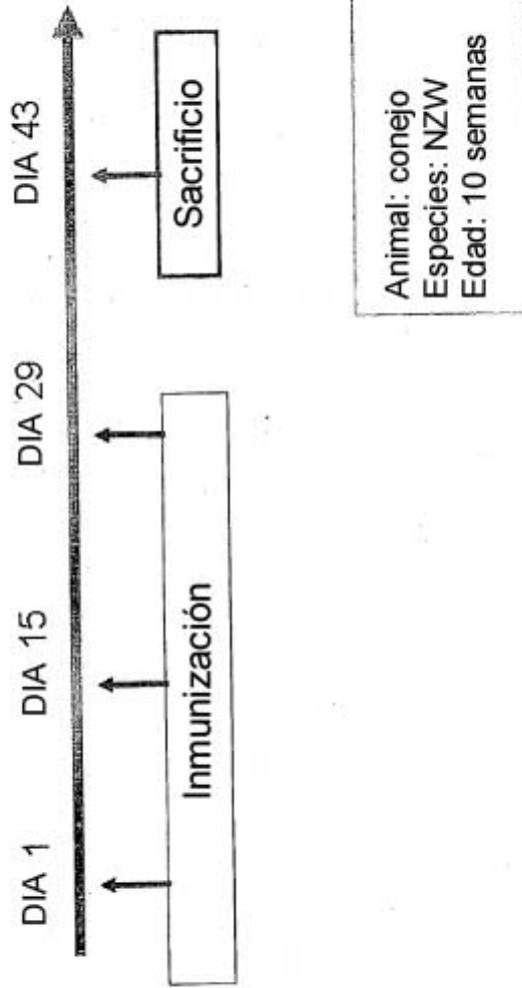


Figura 16

Estudio de inmunogenicidad en conejos de conjugados Hib PRP-LTS61K

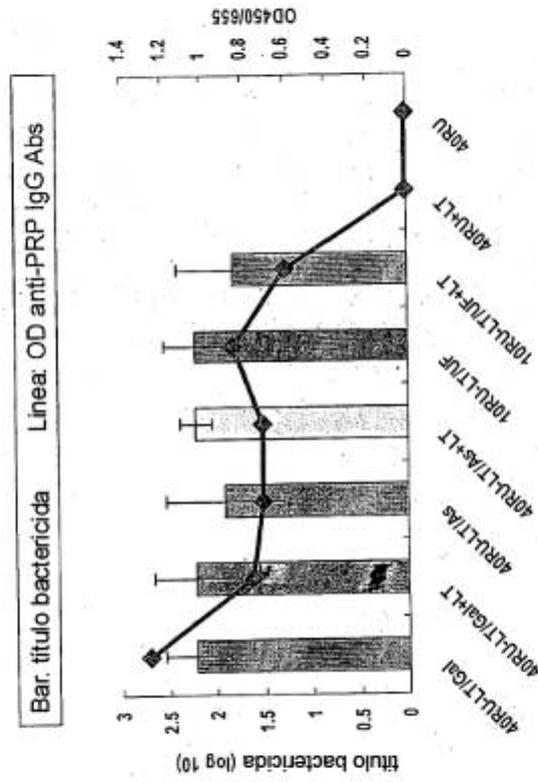


Figura 17

Estudio de inmunogenicidad en conejos de conjugados Hib PRP-LTS61K

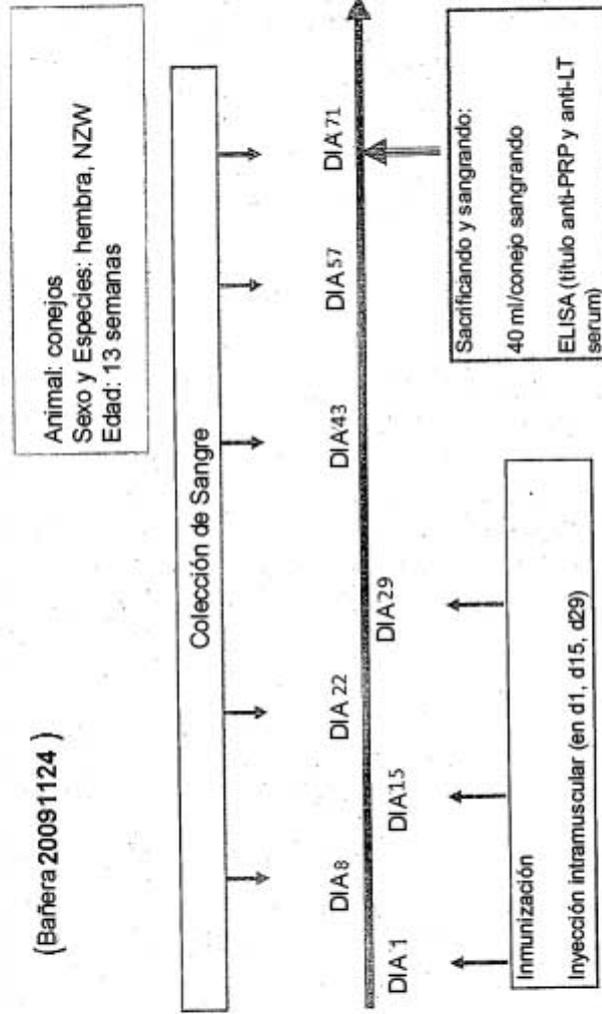


Figura 18

Estudio de inmunogenicidad en conejos de conjugados Hib PRP-LTS61K
Títulos bacteridas (BA) y títulos anti-PRP IgG Ab (OD)

(baño conejo serum 20091124)

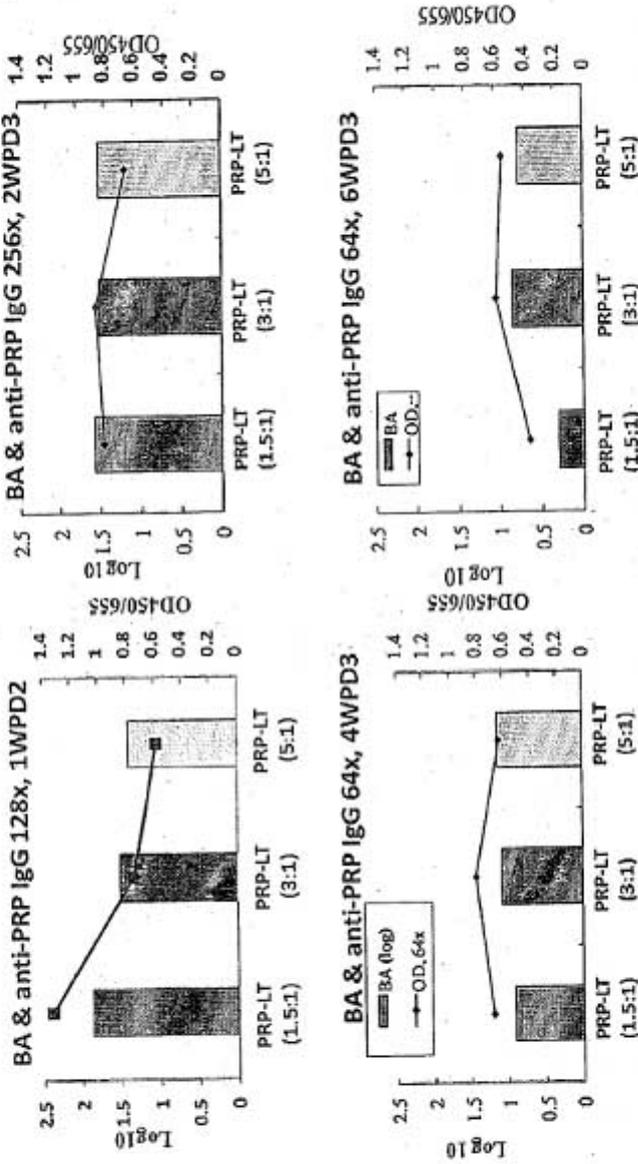


Figura 19

Resumen ELISA de inmunogenicidad en conejos

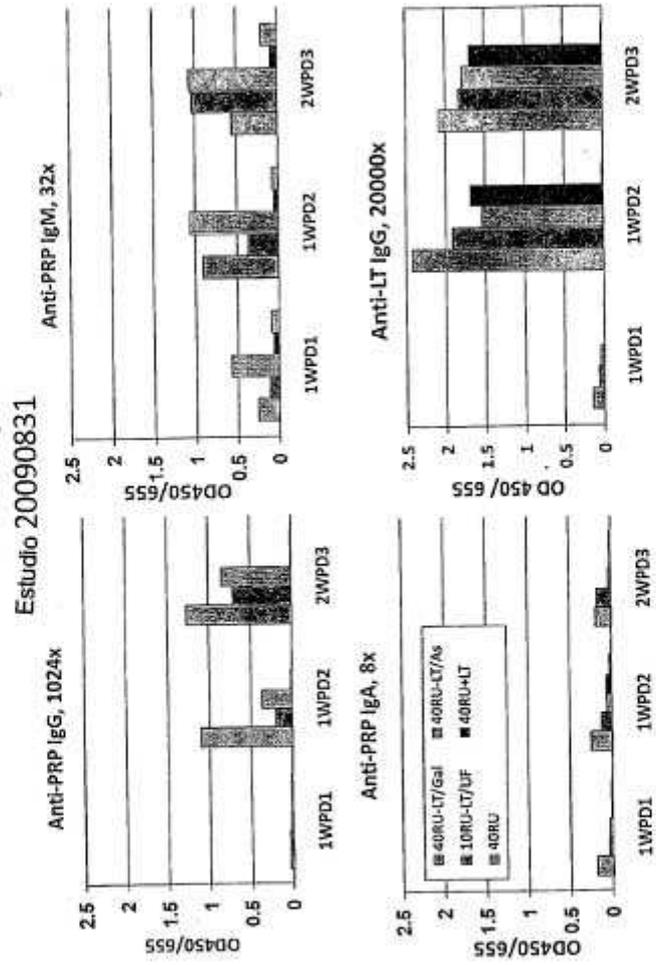


Figura 20

Ensayo serum bactericida en conejos & anti-PRP IgG Ab

(Estudio 20090831)

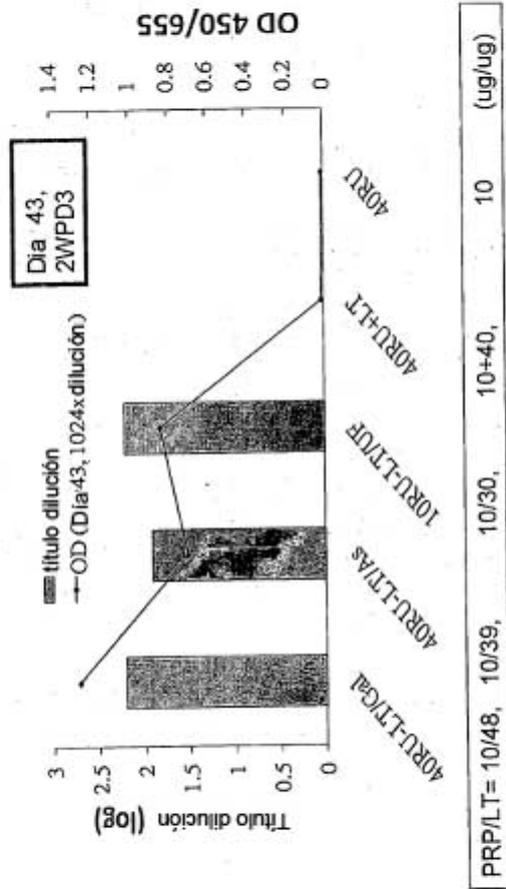


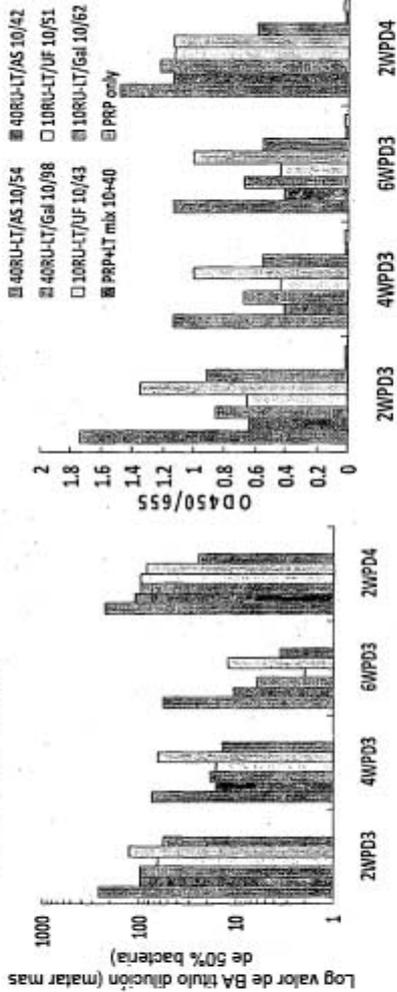
Figura 21

Ensayo Bactericida serum en conejos y anti PRP IgG Ab tras 4ª inmunización

Estudio 20100408

Resultados ensayos serum bactericidas Anti-PRP IgG respuesta anticuerpos

BA, Día 43 a día 92, 20100428 OD450/655, Día 43 a día 92, 20100428



2WPD3 = 2 semanas post dosis 3
 4WPD3 = 4 semanas post dosis 3
 6WPD3 = 6 semanas post dosis 3
 2WPD4 = 2 semanas post dosis 4

Figura 22

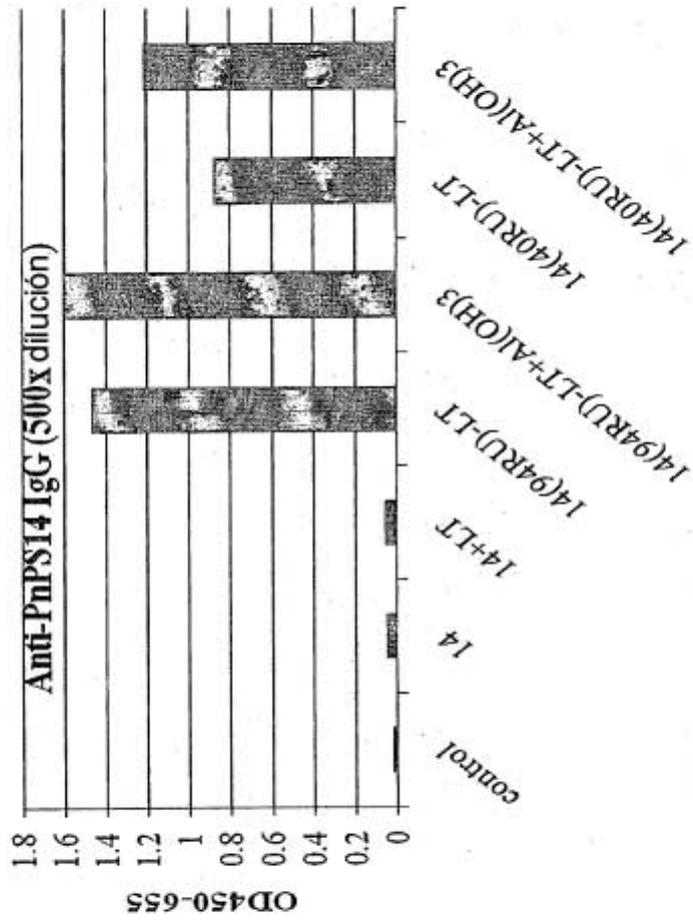


Figura 23