

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 832**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014** **PCT/EP2014/054379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014** **WO14135651**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014** **E 14708064 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016** **EP 2863943**

54 Título: **Vacuna acelular contra la tosferina**

30 Prioridad:

08.03.2013 US 201361774993 P
27.05.2013 EP 13169328

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.01.2017

73 Titular/es:

JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

POOLMAN, JAN THEUNIS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 597 832 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 acelular contra la tosferina

La invención se refiere al campo de la atención sanitaria. Más particularmente, se refiere al campo de las vacunas acelulares contra la tosferina.

Antecedentes de la invención

Bordetella pertussis es el agente causante de la tos ferina. La introducción de vacunas de células enteras muertas de *B. pertussis* (wP) en la década de 1940 ha tenido éxito en la reducción de la morbilidad y la mortalidad debido a la tos ferina en niños y lactantes [http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pert.pdf; Bisgard, K.M. http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pertussisguide/downloads/chapter1.pdf.2000; Edwards, K.M. y Decker, M.D. Pertussis vaccines. e Vaccines (Eds. Plotkin, S.A., Orenstein, W.A. y Offit, P.A.) Elsevier Health Sciences, 2008. 467–517; texto al que se ha referencia en el presente documento como "Vaccines, Plotkin 2008"]. No obstante, la tos ferina sigue siendo un problema importante en niños de todo el mundo. Las estimaciones realizadas por la OMS sugieren que en 2008 se produjeron aproximadamente 16 millones de casos de tos ferina y que murieron aproximadamente 195.000 niños por esta enfermedad.

Desde la década de 1990, las vacunas wP se han sustituido por las vacunas acelulares contra la tosferina (aP, *acellular pertussis*) en la mayoría de los países de ingresos altos y, más recientemente, también en algunos países de ingresos medios. Las vacunas acelulares contra la tos ferina induce relativamente menos efectos secundarios en comparación con las vacunas wP, que se asocian con un riesgo alto de fiebre ($\geq 38^\circ\text{C}$), reactogenicidad en el lugar de la inyección y, aunque en menor medida, convulsiones y episodios hipotónicos-hiporrespuesta [Zhang, Cochrane Database Syst Rev 2011].

De una a dos décadas después de introducir las vacunas aP, varios países han comunicado un aumento de las notificaciones de tos ferina en adolescentes y adultos, incluidos EE.UU., Reino Unido, Australia, Noruega y Países Bajos. Entre las posibles explicaciones se incluyen mejor diagnóstico y vigilancia, adaptación de las cepas de *B. pertussis* en circulación a las vacunas w/o un aumento de la inmunidad disminuida asociada con las vacunas aP [Tanaka, Jama 2003, 290: 2968–2975; Satoh, Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2010, 33: e81–88; Zepp, Lancet Infect Dis 2011; De Greeff, PLoS One 2010, : e14183; Tan, Pediatr Infect Dis J 2005, 24(5 Suppl): S10–18].

En la actualidad, todas las vacunas aP autorizadas consisten en un mínimo de uno, aunque principalmente varios, hasta un máximo de cinco factores de virulencia de *B. pertussis* (destoxificada). Todas las vacunas aP contienen el toxoide de pertussis (PT). Las vacunas aP de múltiples componentes incluyen, como mínimo, (PT) y la adhesina de la superficie de *B. pertussis* hemaglutinina filamentososa. Con el aumento de la valencia, están presentes además una o más además de las adhesinas pertactina (PRN) y fimbrias de tipo 2 y de tipo 3 (FIM2 y FIM3, en conjunto denominadas FIM o FIM2/3 en el presente documento) [Edwards, en: Vaccines, Plotkin, 2008. 467–517].

El documento WO 96/34883 describe dosis de 1 a 10 μg de FIM por dosis humana, con dosis de 10 y 5 μg por dosis humana en una vacuna aP de ejemplo, mientras que en realidad solo se probaron dosis de 5 μg por dosis humana y las vacunas probadas se consideraron eficaces.

En general se cree que las vacunas aP5 (vacunas acelulares contra la tosferina con los cinco componentes PT, FHA, PRN, FIM2/3; DTaP5 son vacunas aP5 que además comprenden el toxoide del tétanos y el toxoide de la difteria) son las vacunas aP más eficaces actualmente disponibles. Las cantidades individuales de los componentes aP presentes en las vacunas aP5 registradas comercialmente disponibles son (en microgramos por dosis humana): 2,5–20 para PT, 5–20 para FHA, 3 para PRN y 5 para FIM.

En varios de los ensayos clínicos de eficacia de la vacuna acelular contra la tosferina en Europa a mediados de la década de 1990, se hicieron esfuerzos para determinar las correlaciones inmunitarias de protección para los componentes individuales de las vacunas aP. Utilizando datos del ensayo sueco DTaP5 (PT + FHA + PRN + FIM2/3) se demostró una correlación estadísticamente significativa entre la protección clínica y la presencia en el suero preexposición de anticuerpos IgG contra PRN, FIM2 y PT, [Storsaeter, Vacuna 1998, 16: 1907–1916]. FIM3 parece ser un componente no protector en DTaP5 [Poolman, Expert Reviews Vaccines 2007, 6: 47–56].

Los sueros recogidos de los sujetos de un ensayo con vacunas en Alemania permitió la estimación de los niveles específicos de anticuerpos frente a PT, FHA, PRN y FIM2 que se correlacionaban con la protección, lo que demostró que solo los anticuerpos contra PRN y PT estaban asociados significativamente con la protección [Stehr, 1998, Pediatrics 101: 1–11; Cherry, 1998, Vaccine 16: 1901–1906]. Además, los estudios preclínicos han demostrado que la adición de PRN mejora el nivel de la protección conferida por las vacunas que contienen PT y FHA en un modelo de infección intranasal murino [Guiso, 1999, Vaccine 17: 2366–2376; DeNoel, 2005, Vaccine 23: 5333–5341] Y que los anticuerpos contra PRN fueron cruciales para la opsonofagocitosis de *B. pertussis* [Hellwig, 2003, JID 188: 738–742]. En conjunto, estos datos indican que PT y PRN son los principales antígenos protectores en las actuales vacunas acelulares contra la tos ferina.

Como parte de un ensayo prospectivo de eficacia de la vacuna aP, se midió la IgG protectora contra PT, FHA, PRN y FIM2/3 en muestras de suero consecutivas obtenidas de los participantes durante un período de 18 meses. Durante los 18 meses, el porcentaje de decaimiento en los niveles de IgG contra PT fue más fuerte (reducción del 73 % en la media geométrica del título de IgG) y fue significativamente mayor que el porcentaje de reducción de los anticuerpos contra PRN, FHA y FIM. Por el contrario, los anticuerpos IgG contra PRN presentaron la tasa de decaimiento más baja (reducción del 56 % de la media geométrica del título de IgG) [Le 2004, JID, 190: 535–544].

La combinación de las dos observaciones de que 1) PT y PRN son los principales antígenos protectores en las vacunas aP y 2) que los anticuerpos contra PT tienen una tasa de decaimiento significativamente más alta que los anticuerpos contra PRN, pone de relieve que los anticuerpos anti-PRN son cruciales para proporcionar protección a largo plazo mediada por aP contra la infección producida por *B. pertussis*.

Sin embargo, en los últimos años se ha observado la aparición de cepas de *B. pertussis* que no expresan PRN en todo el mundo, por ejemplo en Francia, Japón, Países Bajos, EE.UU., Finlandia, Noruega y Suecia [Bouchez, 2009, Vaccine 27: 6034–41; Hegerle, 2012, Clin. Microbial. Infect. 18: E340–346; Otsuka, 2012, PloS One 7: e31985; Advani, 2013, J. Clin. Micro 51: 422–428]. Un estudio reciente en EE.UU. mostró que 11 de los 12 aislados de *B. pertussis* cultivados a partir de especímenes de niños hospitalizados en Filadelfia en 2011 y 2012 eran, de hecho, negativos para PRN [Queenan, 2013, NEngl J Med. 368: 583–4]. Actualmente no se sabe si esta adaptación de la cepa está o no dirigida principalmente por la vacuna. Es posible que estas cepas negativas para PRN puedan escapar de la inmunidad inducida por la vacuna, especialmente cuando los títulos anti-PT han disminuido, y que esto ha contribuido al aumento observado en la enfermedad producida por *B. pertussis*.

Por tanto, las vacunas aP autorizadas y comercializadas actualmente no parecen suficientemente eficaces, especialmente contra las cepas emergentes negativas para PRN. Sigue habiendo la necesidad de nuevas vacunas aP que tengan una eficacia mejorada, en particular contra tales cepas de *B. pertussis* negativas para PRN.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que las vacunas aP que comprenden una dosis alta de FIM2/3 muestran una protección significativamente mejorada las cepas de *B. pertussis* negativas para PRN. La invención proporciona una composición de vacuna acelular contra la tosferina (aP) que comprende antígenos de *B. pertussis*, toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), y los tipos de fimbrias 2 y 3 (FIM), y, opcionalmente, pertactina (PRN), en la que FIM está presente en una cantidad de 12 a 100 µg por dosis humana

En ciertas realizaciones, FIM está presente en una cantidad de 15–80, 15–60, 20–60 o 12–50, 15–50, 20–50, 20–30, 20–25, o 12–30, o 12–25 o aproximadamente 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 µg por dosis humana.

En realizaciones preferidas, las vacunas aP de la invención comprenden pertactina (PRN).

En ciertas realizaciones, PT está genéticamente destoxificada.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden además antígenos de uno o más patógenos distintos a *B. pertussis*.

En ciertas realizaciones de la misma, el tratamiento comprenden uno o más de: a) toxoide del tétanos; b) toxoide de la difteria; c) conjugado de polisacárido u oligosacárido de Hib de tipo b de *Haemophilus influenzae*; d) el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg); y e) el virus de la polio inactivado (IPV). En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una composición de vacuna acelular contra la tosferina de acuerdo con la invención, el toxoide del tétanos y el toxoide de la difteria.

En determinadas realizaciones, la composición de acuerdo con la invención comprende además un adyuvante. En ciertas realizaciones, el adyuvante comprende una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, o ambos, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

La invención también proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, o para vacunarle, contra *B. pertussis*, que comprende administrar al sujeto una composición de acuerdo con la invención. La invención también proporciona un método para proteger a un sujeto de la tos ferina causada por la infección con una cepa negativa para PRN de *B. pertussis*, que comprende administrar al sujeto una composición de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona las composiciones de acuerdo con la invención para su utilización en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, o para vacunarle, contra *B. pertussis*, mediante la administración al sujeto de la composición. La invención también proporciona las composiciones de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, o para vacunarle, contra *B.*

pertussis, mediante la administración al sujeto de la composición. En ciertas realizaciones, la *B. pertussis* contra la cual se desea una respuesta inmunitaria comprende una cepa negativa para PRN.

La invención también proporciona un método para vacunar a un sujeto humano contra *Bordetella pertussis*, opcionalmente, una cepa de *Bordetella pertussis* negativa para PRN, que comprende administrar al sujeto los siguientes antígenos de *Bordetella pertussis*: toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y las fimbrias de los tipos 2 y 3 (FIM), y, opcionalmente, pertactina (PRN), en la que FIM se administra en una cantidad de 12-100 µg.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1. Media del log₁₀ de UFC de *B. pertussis* por pulmón los días día 0, 2, 5 y 8 después de la exposición intranasal en ratones vacunados con una vacuna DTaP5 (aP5) o aP5 + FIM. Se vacunó a los ratones a las 4 y 7 semanas de edad y se les expuso por vía intranasal a las 9 semanas a diferentes cepas de *B. pertussis*: OMS 18323 (Fig. 1A), un aislado clínico negativo para PRN, PRN-STOP (Fig. 1B) y un aislado clínico negativo para PRN, PRN-IS (Fig. 1C). * p < 0,05 comparando la media del log₁₀ de los recuentos UFC tras la vacunación con aP5 y aP5 + FIM a cada punto de tiempo específico, usando la prueba exacta de Wilcoxon. # p < 0,01 comparando el perfil de respuesta-tiempo del log₁₀ de UFC desde el día 0 al día 8, tras la vacunación con un aP5 y aP5 + FIM usando el análisis de la covarianza.

Figura 2. Media del log₁₀ de los recuentos de UFC del pulmón en ratones expuestos a la cepa l195 de *B. pertussis* negativa para PRN a la novena semana después de la vacunación con una vacuna aP2 a 1/10 de la dosis humana con la adición de una cantidad creciente de FIM a las 4 y 7 semanas de edad. Para detalles, véase el ejemplo 2.

Figura 3. Media del log₁₀ de los recuentos UFC del pulmón en ratones 5 días después de la exposición a 4 cepas de *B. pertussis* a las 9 semanas de la vacunación con una vacuna aP5 a 1/10 de la dosis humana con o sin la adición de 5 µg de FIM a las 4 y 7 semanas de edad. Para detalles, véase el ejemplo 3.

Descripción detallada de la invención

La invención pertenece a composiciones que comprenden factores de virulencia de *Bordetella pertussis* destoxificados, en particular toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), y los tipos de fimbrias 2 y 3 (FIM), y, opcionalmente, pertactina (PRN), en la que FIM está presente en una cantidad de 12 a 100 µg por dosis humana. Dichas composiciones se pueden usar como una vacuna acelular contra la tos ferina (aP) y en el presente documento se demuestra que son, sorprendentemente, más eficaces que una vacuna aP5 mejor de su clase disponible en la actualidad.

En particular, el aumento de la dosis de FIM en comparación con la dosis descrita y recomendada anteriormente para este componente da lugar a una eficacia mejorada de la vacuna contra cepas negativas para PRN recién aparecidas de *B. pertussis*, en comparación con una vacuna aP5 comercializada y otras vacunas aP comercializadas. Esto es muy sorprendente, ya que la técnica anterior no proporciona ninguna sugerencia para aumentar las cantidades de FIM por dosis humana sobre la recomendada de 5 µg, y, en realidad, la técnica ofrece sugerencias de que el aumento de la cantidad de este componente no da lugar a una eficacia mejorada.

El efecto de un aumento de la dosis de FIM en las vacunas se ha investigado en, por ejemplo, seres humanos y modelos animales. En lactantes de 17-19 meses de edad se demostró que no había diferencias en la frecuencia de reacciones adversas, los títulos de anticuerpos, o en la elevación del título medio después de la inmunización entre dos vacunas aP de 5 componentes, ya sea con 10 µg de PT, 5 µg de FHA, 3 µg de PRN y 5 µg de FIM2/3 o incluyendo el doble de la cantidad de todos estos antígenos (Halperin, Arch Pediatr Adolesc Med 1994, 148: 1220-1224).

En modelos animales se encontró que no había diferencias en el peso corporal, el peso del bazo, los recuentos de leucocitos periféricos y la eliminación de *B. pertussis* de los pulmones, cuando se vacunó a los ratones con tres tipos de vacunas contra la tos ferina que contenían diferentes cantidades de FIM (Morokuma, Devel Biol Stand 1991, 73: 223-232).

En otro estudio se mostró que no había diferencias en el nivel de anticuerpos IgG entre los ratones que recibieron una dosis alta (20 µg) o una dosis baja (4 µg) de FIM2 o FIM3 recombinantes. Siete días después de la exposición intranasal no hubo diferencias en la carga bacteriana en el pulmón de los ratones control, los ratones vacunados con FIM2 o los ratones vacunados con FIM3 (Xu, BMC Microbiology 2009, 9: 274-281).

Por tanto, el hallazgo de los inventores de una mayor eficacia de la vacunación con una dosis alta de FIM en el modelo de exposición de la nasofaringe de ratón es muy sorprendente.

Por lo tanto, en la técnica anterior no hay indicaciones ni sugerencias de que el aumento de la cantidad de FIM en las vacunas aP sobre la cantidad usual daría lugar a una eficacia mejorada contra las cepas mutantes negativas para PRN recién aparecidas.

Una "dosis humana", como se usa en el presente documento (a la que a se hace referencia como una "dosis humana única"), significa una cantidad de vacuna que se administra a un ser humano en una única administración. Típicamente, esta cantidad está presente en un volumen de 0,1-2 ml, por ejemplo, 0,2-1 ml, típicamente de 0,5 ml. Por tanto, las cantidades indicadas pueden estar presente a una concentración de microgramos por 0,5 ml de vacuna a granel. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, una dosis humana (única) equivale a 0,5 ml.

Los componentes de varias vacunas aP que están comercializadas o se han comercializado se describen en las Tablas 21-3 y 21-4 de "Vaccines. 5ª edición. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Sección 2, Capítulo 21 "Pertussis vaccines", K.M. Edwards y M.D. Decker. p. 467–517. Las composiciones de vacuna aP de la invención comprenden PT, FHA, y FIM2/3, y, preferentemente, PRN. Estos componentes son componentes estándar en diferentes vacunas aP comercializadas y están disponibles de diferentes fabricantes (véase, por ejemplo, la Tabla 21-3 del capítulo 21 de la Vaccines, Plotkin 2008) y están comercialmente disponible en., por ejemplo, List Biological Laboratories, Inc (Campbell, California). Las composiciones de la invención comprenden la toxina pertussis destoxificada, también conocida como toxoide de pertussis (PT). El PT también puede destoxificarse química o genéticamente. La destoxificación química puede realizarse, por ejemplo, mediante cualquiera de diversos métodos de desintoxicación química convencionales, tales como tratamiento con formaldehído, peróxido de hidrógeno, tetranitrometano o glutaraldehído. Por ejemplo, la desintoxicación se puede realizar como se describe en la página 17 y el ejemplo 3 del documento WO 96/34883. En ciertas realizaciones preferidas, el PT está destoxificado genéticamente. Esto se puede realizar haciendo mutaciones en el gen de la toxina pertussis para inactivar la actividad enzimática de la subunidad catalítica S1 de la toxina pertussis y se ha descrito en, por ejemplo, los documentos US 7.144.576, US 7.666.436 y US 7.427.404. Mutaciones particularmente ventajosas para destoxificar la toxina pertussis se proporcionan en, por ejemplo, el documento US 7.427.404. Una realización particularmente ventajosa es la toxina pertussis en la que el residuo de aminoácido Glu129 en la secuencia de aminoácidos de la holotoxina de pertussis en la subunidad S1 está sustituida por Gly (E129G) y Arg9 está sustituida por Lys (R9K) (patente de Estados Unidos 7.427.404; Buasri, BMC Microbiología de 2012, 12: 61). Dicho PT destoxificado genéticamente (E129G, R9K) también se puede aislar convenientemente de una cepa genéticamente modificada que muestra una mayor producción de este PT [Buasri, 2012, citado anteriormente]. Las ventajas del uso de mutantes destoxificados genéticamente son que no se requiere el uso de productos químicos peligrosos o el uso es menor para la destoxificación, la conservación mejorada de los epítomos de los antígenos de PT y, por tanto, mejores respuestas inmunitarias a la misma y/o se pueden usar cantidades menores de antígeno en la vacuna. En otras realizaciones, el PT está destoxificado genéticamente. El PT destoxificado química o genéticamente es ampliamente utilizado en las vacunas aP (véase, por ejemplo, la Tabla 21-3 del capítulo 21 de Vaccines, Plotkin 2008). El PT puede obtenerse y purificarse, por ejemplo, como se describe en la página 16 y el ejemplo 2 del documento WO 96/34883. El PT también se puede obtener usando métodos como, por ejemplo, los descritos en los documentos US5085862, WO96/34623, US4705868, EP0336736, WO9115505, EP0306318, EP0322533, EP0396964, EP0275689, WO91/12020, EP0427462, WO9819702 y US4784589.

El PT destoxificado químicamente o genéticamente está disponible de diversas fuentes comerciales. En ciertas realizaciones, la cantidad de PT en una vacuna de acuerdo con la invención es 2–50 µg 5–40 µg, 10–30 µg, o 20–25 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml).

Las composiciones de acuerdo con invención en determinadas realizaciones comprenden pertactina (PRN), una proteína de membrana externa de 69 kDa de *B. pertussis* (por lo tanto, a la que a veces también se hace referencia como antígeno de 69Ka). La PRN puede obtenerse y purificarse, por ejemplo, como se describe en la página 18–19 y el ejemplo 2 del documento WO 96/34883, que se incorpora en el presente documento por referencia. También puede obtenerse, por ejemplo, como se describe en los documentos EP0162639, EP0484621, US6444211, US5276142, US5101014, EP0336736, WO96/34623, WO90/16651 y WO90/56076. La PRN también puede aislarse convenientemente de las cepas de *B. pertussis* que se han modificado genéticamente para que expresen niveles altos de PRN, tales como los descritos en, por ejemplo, [Buasri, 2012, citado anteriormente].

En ciertas realizaciones, la cantidad de PRN en una vacuna de acuerdo con la invención es 0,5–100 µg, 1–50 µg, 2–20 µg, 3–30 µg, 5–20 µg, o 6–10 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml) [véase, por ejemplo, el documento EP 0928198].

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden hemaglutinina filamentosa (FHA), una adhesina principal de 230 kDa de *B. pertussis* que es importante para la adherencia de *B. pertussis* a las células epiteliales ciliares del huésped de las vías respiratorias, y un componente establecido de las vacunas aP multivalentes comercializadas. La FHA puede obtenerse y purificarse, por ejemplo, como se describe en la página 17-18 y el ejemplo 2 del documento WO 96/34883, que se incorpora en el presente documento por referencia. La FHA también puede obtenerse, por ejemplo, como se describe en los documentos WO9013313, EP0484621, WO9634623, EP0336736, WO9115505, US4784589 y WO9004641.

En ciertas realizaciones, la cantidad de FHA en una vacuna de acuerdo con la invención es 2–50 µg 5–40 µg, 10–30 µg, o 20–25 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml).

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aglutinógenos fimbriales 2 y 3, también conocidos como fimbrias 2 y 3 o aglutinógenos 2 y 3 o Agg 2 y 3 (a los que en el presente documento se hace referencia como FIM2 y FIM3, o como "FIM" o "FIM2/3", que es una combinación de FIM2 y FIM3, como una mezcla). Típicamente, en una composición de acuerdo con la invención, la relación en peso de FIM 2 y FIM 3 es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1, por ejemplo, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3:1, por ejemplo, de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1. Las FIM también se pueden obtener, por ejemplo, como se describe en los documentos WO9634623, US4784589, US6475754, EP0555894, WO9858668 y WO207764.

La cantidad de FIM en una vacuna de acuerdo con la invención es de 12–100 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml). En ciertas realizaciones, esta cantidad es de 12–50 µg o 12–30 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml). En realizaciones preferidas de la invención, la cantidad de FIM es de al menos 15 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml). En ciertas realizaciones, esta cantidad es 15–100 µg, 15–80 µg, 15–60 µg, 15–50 µg, 15–30 µg o 15–25 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml). En realizaciones adicionales preferidas de la invención, la cantidad de FIM es de al menos 20 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml). En ciertas realizaciones, esta cantidad es 20–100 µg, 20–80 µg, 20–60 µg, 20–50 µg, 20–30 µg, 20–25 µg, o 25–50 µg por dosis humana (típicamente 0,5 ml).

Las FIM puede aislarse de *B. pertussis* o se pueden producir de forma recombinante, o, por ejemplo están comercialmente disponible en List Biological Laboratories, Inc (Campbell, California; <http://www.listlabs.com>, producto n.º 186 en el catálogo online).

En ciertas realizaciones preferidas, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende por dosis humana (o por 0,5 ml de vacuna a granel): 10–25 µg PT, 10–25 µg de FHA, 3–8 µg de PRN y 12–50 µg de FIM. En ciertas realizaciones preferidas, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende por dosis humana (o por 0,5 ml de vacuna a granel): 20–25 µg PT, 20–25 µg de FHA, 3–8 µg de PRN y 12–50 µg de FIM. En ciertas realizaciones preferidas, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende por dosis humana (o por 0,5 ml de vacuna a granel): 20–25 µg PT, 20–25 µg de FHA, 3–8 µg de PRN y 12–25 µg de FIM. En cierta realización, la invención proporciona una vacuna que comprende por dosis humana (o por 0,5 ml de vacuna a granel): aproximadamente 20 µg de PT, aproximadamente 20 µg de FHA, aproximadamente 3 µg de PRN y aproximadamente 15–20 µg de FIM.

Una manera simple de preparación de una vacuna de acuerdo con la invención es añadir FIM disponible comercialmente a una vacuna aP5 disponible comercialmente. Una vacuna de la invención también se puede preparar simplemente mediante la adición de FIM a una vacuna aP comercialmente disponible que comprende PT y FHA pero no todavía FIM (aP2), o una vacuna aP comercialmente disponible que comprende PT, FHA y PRN, pero aún no FIM (aP3). En ciertas realizaciones, la FIM se puede adsorber primero a un adyuvante si se desea, por ejemplo, a hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio, antes de añadir a los otros componentes. En otras realizaciones, la FIM se añade a los otros componentes sin adsorción previa al adyuvante.

El término "aproximadamente" para los valores numéricos que se utilizan en la presente divulgación significa el valor de $\pm 10\%$.

Las composiciones de la invención pueden, en ciertas realizaciones, también comprender componentes proteicos que no son de pertussis, por ejemplo para obtener vacunas de combinación [Decker, M.D., Edwards, K.M. y Bogaerts, H. H. Combination vaccines. En Vaccines (Eds. Plotkin, S., Orenstein, W.A. y Offit, P.A.) Elsevier Health Sciences, 2008. 1069–1101]. En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención pueden, por lo tanto, comprender antígenos derivados de uno o más patógenos distintos de *B. pertussis*. En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden uno o más de los siguientes: toxoide del tétanos (TT), toxoide de la difteria (DT); c) conjugado de polisacárido u oligosacárido de *Haemophilus influenzae* de tipo b (*Hib*), el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), el virus de la polio inactivado (IPV).

Se conocen vacunas combinadas de aP con tales componentes que no son de pertussis y se utilizan ampliamente. Por ejemplo, en los documentos WO2010/046935, US6013264, WO2007/054820, WO98/000167 y EP1946769 se ha descrito la preparación de vacunas combinadas.

En ciertas realizaciones, la aP5 (o aP4: PT, FHA, FIM2/3) de acuerdo con la invención está en una composición que comprende, además, DT y TT, de modo que se proporciona una vacuna de DTaP5 (o DTaP4) de acuerdo con la invención. Las vacunas DTaP5 se utilizan ampliamente para prevenir la difteria, el tétanos y la tos ferina. La vacuna de acuerdo con la invención tiene una mayor cantidad de FIM que las vacunas DTaP5 descritas antes y es más eficaz frente a cepas de *B. pertussis* negativas a PRN que las vacunas DTaP5 convencionales.

Una forma para aislar, purificar y destoxificar el DT se describe en la página 33 a 34 del documento WO 96/34883, que se incorpora en el presente documento por referencia. El DT también obtenerse, por ejemplo, como se describe en los documentos US4709017, US5843711, US5601827, US5917017 y WO96/34623.

Una forma para aislar, purificar y destoxificar el TT se describe en la página 34–36 del documento WO 96/34883, que se incorpora en el presente documento por referencia. El TT también obtenerse, por ejemplo, como se describe en los documentos EP0209281, EP0478602 y WO96/34623.

El conjugado de polisacárido u oligosacárido de Hib puede obtenerse, por ejemplo, como se describe en los documentos WO2007/054820, WO2004/110480, US6333036, WO2010/046935, US4372945, US4474757, WO95/08348, WO2010/046935, US4673574, EP0161188, EP0208375 y EP0477508. El antígeno de Hib puede ser, por ejemplo, el polisacárido capsular de Hib, o un conjugado del polisacárido o un oligosacárido derivado del mismo a una proteína vehículo tal como DT, TT, o CRM₁₉₇, una variante no tóxica de la toxina diftérica aislada de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (b197).

El HBsAg puede obtenerse, por ejemplo, como se describe en los documentos EP0226846, EP0299108, US6013264, WO2007/054820, WO2010/046935 y WO9324148.

El IPV puede ser monovalente, que contiene un tipo de virus de la polio (de tipo 1, 2 o 3), o divalente (que contiene dos tipos de poliovirus, por ejemplo, los tipos 1 y 2, 1 y 3 o 2 y 3), o trivalente (que contiene tres tipos de poliovirus, es decir, los tipos 1, 2 y 3). Preferentemente, el IPV de acuerdo con invención contiene los tipos de poliovirus inactivados 1, 2 y 3 puede obtenerse, por ejemplo, como se describe en los documentos US 4.525.349 y WO2011/006823.

Estos componentes que no son de pertussis se pueden obtener de diversos fabricantes. Se describen ejemplos en ["Vaccines." 5ª edición. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Sección 2, Capítulo 38 ("Combination vaccines", M.D. Decker, K.M. Edwards, H. H. Bogaerts, pág. 1069–1101)].

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden una composición que comprende los componentes de pertussis (vacuna aP5 o aP4) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente (es decir, que comprende 12–100 µg de FIM por dosis humana y PT, FHA y, opcionalmente, PRN; a las que más adelante en el presente documento se hace referencia como "aP de acuerdo con la invención", o "fórmula aP5*" para abreviar), y DT.

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención y TT.

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención e IPV (a la que en el presente documento se hace referencia como "aP5*–IPV").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT y TT (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT, TT y Hib (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*–Hib").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT, TT e IPV (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*–IPV").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT, TT y HBSAg (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*–HepB").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT, TT, Hib y HBSAg (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*–Hib–HepB").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT, TT, Hib e IPV (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*–Hib–IPV").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT, TT, HBSAg e IPV (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*–HepB–IPV").

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aP de acuerdo con la invención, DT, TT, Hib, HBSAg e IPV (a la que en el presente documento se hace referencia como "DTaP5*–Hib–HepB–IPV").

Opcionalmente se pueden añadir otros componentes que no son de pertussis, por ejemplo, componentes que en ocasiones se combinan con aP en vacunas de combinación, tales como antígenos de meningococos y/o neumococos.

Para las vacunas combinadas, las cantidades de los componentes que no son de pertussis se pueden variar. En general, las cantidades de estos componentes como están típicamente presentes en vacunas individuales o de combinación se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. Véase, por ejemplo, "Vaccines." 5ª edición, S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Sección 2, para las vacunas de diversos componentes y de combinación, en particular, el capítulo 38 describe vacunas de combinación que incluyen vacunas aP con los componentes mencionados anteriormente [Decker, pág. 1069–1101]; el capítulo 10 describe DT [Vitek, pág. 139–156]; el capítulo 31 describe TT [Wassilak, pág. 805–840]; el capítulo 25 describe vacunas de IPV [Plotkin, pág. 605–630]; el capítulo 11 describe vacunas de Hib [Chandran, pág. 157–176]; y el capítulo 13 describe vacunas de la hepatitis B (basados en HBsAg) [Mast, pág. 205–242]. Los ejemplos no limitantes de cantidades adecuadas (también es habitual expresar cantidades de DT y TT en IU o en Lf (unidades de floculación), véase, por ejemplo [Decker, en: Vaccines, pág. 1069–1101, *mencionado anteriormente*], pero en el presente documento se proporcionan microorganismos) of de los antígenos por dosis serían, por ejemplo: 1–100 µg, por ejemplo, 2–40 µg, por ejemplo, 6–25 µg, por ejemplo, 15–25 µg de DT; 1–50 µg, por ejemplo 2–20 µg, por ejemplo 5–10 µg de TT; 1–100 µg, por ejemplo de 3 a 40 µg de proteína HBsAg por mililitro; 0,1–100 µg, por ejemplo de 0,2 a 50 µg, por ejemplo de 1 a 25 µg, por ejemplo 2–10 µg de polisacárido u oligosacárido capsular de Hib del mismo en forma de un conjugado con una proteína vehículo; productos que contienen IPV salvaje (wt-IPV) en general se formulan para que contengan 40–8–32 de unidades D-Ag por dosis de poliovirus de tipos 1, 2 y 3, respectivamente. Sin embargo, estas cantidades también pueden modificarse, por ejemplo, también pueden usarse cantidades inferiores, tales como 10-20 unidades de D-Ag para el IPV de tipo 1 y las cantidades para los tipos de IPV 2 y 3 también se pueden variar (véase, por ejemplo, el documento EP 2066344). Las cantidades también se pueden variar también de acuerdo con el uso previsto, por ejemplo, las vacunas de refuerzo pueden contener, en determinadas realizaciones, menos unidades de ciertos componentes que las vacunas de sensibilización.

Los componentes proteicos en las composiciones de acuerdo con la invención están destinados a inducir una respuesta inmunitaria tras la administración a un sujeto elegible. Será evidente para el experto que siempre que se haga referencia en el presente documento a proteínas o mutantes de las misma, por ejemplo, toxoides, también se pueden usar partes de las proteínas y pueden tener propiedades preferidas equivalentes o, en algunos casos, propiedades preferentes para la inducción de respuestas inmunitarias. Adicionalmente, las proteínas pueden contener mutaciones (adicionales), tales como deleciones, inserciones, sustituciones, etc. Por lo tanto, fragmentos inmunogénicos y variantes de los componentes proteicos se incluyen dentro del significado de las proteínas indicadas en el presente documento.

Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden utilizar como vacunas acelulares contra la tosferina, o como componentes de vacunas de combinación, que generan respuestas inmunitarias a uno o más de los componentes en las composiciones tras la administración a sujetos elegibles. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta celular y/o humoral. Tales respuestas inmunitarias confieren, preferentemente, protección contra la infección con patógeno o contra la enfermedad o al menos reduce la gravedad de los síntomas causados por el patógeno del que derivan los respectivos componentes (es decir, en cualquier caso, preferentemente, contra B. pertussis, y, preferentemente, también contra mutantes negativos para PRN de los mismos). Las composiciones de acuerdo con la invención pueden, por lo tanto, denominarse convenientemente vacunas. Una dosis de una vacuna es la cantidad que se administra en una única administración a un sujeto. Un sujeto puede ser, adecuadamente, un animal o un ser humano, y en ciertas realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. Muchas vacunas son, adecuadamente, y de hecho preferentemente, administrarse más de una vez en el mismo individuo con un intervalo de tiempo suficiente para obtener un efecto de refuerzo en el individuo, por ejemplo, al menos cuatro semanas, hasta varios años hasta aproximadamente dos décadas entre las administraciones. Normalmente se administran múltiples inmunizaciones a lactantes no tratados previamente. Las composiciones de acuerdo con la invención también se pueden administrar más de una vez, por ejemplo, en una realización no limitante, dos o tres o más veces con un intervalo de al menos 4 semanas, por ejemplo, un intervalo de tiempo de de uno o dos meses entre cada administración. Un ejemplo no limitante es la administración de acuerdo con el programa de EPI, a las 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas de edad. Otro régimen sería a los 2 meses, 4 meses, 6 meses de edad. En ciertas realizaciones se administra una vacuna de refuerzo 10-20 años más tarde, por ejemplo, durante la adolescencia. Se pueden administrar otras vacunas de refuerzo cada diez años. En ciertas realizaciones, aP de acuerdo con la invención se administra dos o tres veces en el primer año de vida, un refuerzo adicional se administra el segundo año de vida y una dosis de refuerzo adicional se administra a los cuatro o cinco años de edad, después de lo cual se administra un refuerzo en adolescentes a aproximadamente los doce años de edad. También se puede seguir la recomendación del refuerzo de Td (una vacuna que contiene TT-DT administrada a adolescentes), es decir, cada diez años y reemplazar Td con Tdap, en el que el componente de pertussis acelular es aP de acuerdo con la invención. Sin embargo, será evidente para el experto que el esquema de vacunación de las vacunas aP de acuerdo con la invención puede modificarse adecuadamente, como se desprende de la amplia variedad de esquemas de vacunación (régimenes) de las vacunas aP comercializadas por diferentes autoridades nacionales (por ejemplo, Tabla 21–5 en "Vaccines." 5ª edición. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Sección 2, Capítulo 21 "Pertussis vaccines", K.M. Edwards & M.D. Decker. p. 467–517).

Las composiciones de acuerdo con la invención también se pueden usar adecuadamente como vacunas de refuerzo para las poblaciones que han sido vacunadas previamente por otras vacunas, sean las vacunas wP o aP de diferente composición o vacunas de combinación que comprenden wP o AP de composición diferente que las

vacunas de la invención. Tales refuerzos pueden usarse, por ejemplo, para la vacunación de adultos o ancianos que no han sido vacunados contra *B. pertussis* durante más de una década. Podría ser útil repetir tales vacunaciones de refuerzo, por ejemplo, aproximadamente una vez cada cinco, diez o quince años. También se ha recomendado para administrar la vacuna acelular con toxoide tetánico, toxoide diftérico y toserínico a mujeres embarazadas con cada embarazo, independientemente del historial previo de Tdap. En ciertas formas de realización, la aP de acuerdo con la invención se administra a un bebé, un niño, un adolescente, un adulto, un anciano o una mujer embarazada, por ejemplo, como aP o como Tdap.

Las composiciones de acuerdo con la invención son composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una composición de acuerdo con la invención y, por lo general, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo o excipiente, a las dosis y concentraciones empleadas, no causa efectos no deseados o nocivos en los sujetos a los que se administran. Dichos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica [Remington. The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company 1990; Frokjaer, S. y Hovgaard, L. Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, 2000; Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press 2000]. Las composiciones preferentemente se formulan y administran en forma de una solución estéril. Las soluciones estériles se pueden preparar por filtración estéril o por otros métodos conocidos *per se* en la técnica. Las soluciones pueden liofilizarse o cargarse en recipientes de dosificación farmacéuticas. El pH de la solución generalmente está en el intervalo de pH de 3,0 a 9,5, por ejemplo un pH de 5,0 a 7,5. Los componentes de la composición típicamente están en una solución que tiene un tampón adecuado farmacéuticamente aceptable y la solución también puede contener una sal. En determinadas realizaciones, hay detergente presente. En ciertas realizaciones, la vacuna se puede formular en una preparación inyectable. Estas formulaciones contienen cantidades eficaces de los componentes proteicos, son soluciones líquidas estériles, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas y, opcionalmente, contienen estabilizantes o excipientes. Se conocen varios ejemplos de formulaciones adecuadas para el almacenamiento y para la administración farmacéutica de vacunas aP o vacunas de combinación (por ejemplo, las Tablas 21-3 y 21-4 en ["Vaccines." 5ª edición. S. Plotkin, et al, mencionada anteriormente]. Ejemplos de diluyentes adecuados son PBS o solución salina. Opcionalmente, puede haber presente un conservante, por ejemplo, fenoxietanol, timerosal o parabenos. Si un conservante está presente, preferentemente está presente en niveles bajos. En caso de que una vacuna de combinación comprenda IPV, preferentemente se evita el uso de timerosal, ya que el timerosal puede conducir a la pérdida de potencia del componente IPV (véase, por ejemplo, Sawyer LA, 1994, Vaccine 12 : 851–856; documento EP 2066344). Otros componentes que pueden estar presentes opcionalmente como constituyentes residuales son polisorbato-80, la gelatina y restos de toxoidación química (por ejemplo, si PT es toxoide químico), tales como glutaraldehído, formaldehído.

Preferentemente, las vacunas de acuerdo con la invención se almacenan a 2-8 °C.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden además uno o más adyuvantes. En la técnica se sabe que los adyuvantes aumentan aún más la respuesta inmunitaria a un determinante antigénico aplicado (para una revisión sobre adyuvantes, véase, por ejemplo, Montomoli, 2011, Expert Rev Vaccines 10: 1053–1061). Entre los ejemplos de adyuvantes adecuados se incluyen sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio; composiciones de emulsión en aceite (o composiciones de aceite en agua), incluyendo emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (véase, por ejemplo, el documento WO 90/14837); formulaciones de saponina, tales como, por ejemplo, QS21 y complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (véase, por ejemplo, los documentos US 5.057.540, WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); agonistas de receptores de tipo Toll (TLR), por ejemplo agonistas de TLR7 (véase, por ejemplo, el documento WO 2012/117377, página 15 a 18 para los ejemplos), por ejemplo, en combinación con una sal de aluminio, por ejemplo, hidróxido de aluminio, al que el agonista de TLR puede ser adsorbido; derivados bacterianos o microbianos, ejemplos de los cuales son monofosforil lípido A (MPL), MPL 3-O-desacilado (3dMPL), oligonucleótidos que contienen el motivo CpG, toxinas bacterianas de ribosilación de ADP, o mutantes de las mismas, tales como la enterotoxina termolábil de *E. coli* LT, la toxina del cólera TC, y similares. Por ejemplo PT y el toxoide del tétanos también tienen propiedades adyuvantes propias. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden aluminio como adyuvante, por ejemplo, en forma de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de aluminio y potasio, o combinaciones de los mismos, en concentraciones de 0,05 - 5 mg, por ejemplo, de 0,075-1,0 mg, de contenido de aluminio por dosis.

En otras realizaciones, las composiciones usadas en la invención no comprenden otros adyuvantes.

Preferentemente, las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención comprenden un adyuvante. En ciertas realizaciones preferidas, el adyuvante es una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o una combinación de los mismos. Preferentemente, uno, más o todos los antígenos de aP son adsorbidos sobre una sal de aluminio. Asimismo, los otros antígenos pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio. En ciertas realizaciones, uno, más o todos los antígenos de aP (PT, FHA, FIM, PRN si están presentes) se adsorben sobre hidróxido de aluminio. En ciertas realizaciones, uno, más o todos los antígenos de aP (PT, FHA, FIM, PRN si están presentes) se adsorben sobre fosfato de aluminio. Formulación de vacunas de aP y vacunas de combinación de aP con sales de aluminio se describe en, por ejemplo, [Denoël, 2002, Vaccine 20: 2551–2555]. Típicamente, los

componentes individuales son adsorbidos individualmente sobre la sal de aluminio y los componentes se mezclan después para formar la formulación de vacuna. Esto también permite preparar vacunas en las que ciertos componentes son adsorbidos sobre una primera sal de aluminio [por ejemplo, $\text{Al}(\text{PO})_4$], mientras que otros componentes se adsorben sobre una segunda sal de aluminio [por ejemplo, $\text{Al}(\text{OH})_3$]. Asimismo, los otros componentes de una vacuna de combinación pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, por ejemplo, DT y TT pueden ser adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, o una combinación de estos. Los componentes DT y TT pueden adsorberse a la misma o a una sal de aluminio diferentes como los componentes de aP. Otros componentes de las vacunas de combinación de valencia creciente también pueden ser adsorbidos sobre sales de aluminio, por ejemplo HBsAg, Hib y/o IPV, pueden o no pueden ser adsorbidos sobre sales de aluminio. En ciertas realizaciones preferidas en las que una vacuna de combinación comprende HBsAg, el HBsAg se adsorbe sobre fosfato de aluminio (véase, por ejemplo, el documento WO 93/24148). Si Hib está incluido en la vacuna de combinación y ciertos otros componentes, tales como uno o más de DT, TT o AP, se adsorben sobre hidróxido de aluminio, el riesgo de interferencia (reducción de la eficacia del componente Hib) se puede reducir, por ejemplo, mediante la adsorción de Hib sobre fosfato de aluminio o utilizar el Hib que no se adsorbe sobre un adyuvante de aluminio, y combinar esto con los otros componentes, ya sea añadiendo simultáneamente (es decir, justo antes de la administración) el Hib, o mediante la mezcla con los otros componentes que han sido adsorbidos sobre hidróxido de aluminio adyuvante, de tal manera que el adyuvante de hidróxido de aluminio se ha presaturado, como se describe con detalle en el documento WO 99/48525. Por tanto, el experto conoce varias formas de formular vacunas de combinación de acuerdo con la invención de una forma adecuada.

En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende PT, FHA, FIM2/3 e hidróxido de aluminio, y, opcionalmente, PRN. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende PT, FHA, FIM2/3 e hidróxido de aluminio, y, opcionalmente, PRN. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende PT, FHA, FIM2/3, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, y, opcionalmente, PRN. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5 *, e hidróxido de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5 * y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5 *, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende aP5*-IPV, e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5*-IPV e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5*-Hib e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5*-HepB e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5*-Hib e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5*-Hib-IPV e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5*-HepB-IPV e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende DTaP5*-Hib-HepB-IPV e hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

La administración de las composiciones de acuerdo con la invención se puede realizar utilizando vías de administración estándar. Entre las realizaciones no limitantes se incluyen la administración parenteral, tal como por inyección, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, transcutánea, intranasal, etc. En una realización, la vacuna se administra mediante inyección intramuscular en el muslo o en el músculo deltoides. El experto conoce las diversas posibilidades para administrar una vacuna de acuerdo con la invención, con el fin de inducir una respuesta inmunitaria a al menos uno de los antígenos en la vacuna. En general, la dosis estándar de la vacuna de la tosferina es de 0,5 ml por vía intramuscular en la cara anterolateral del muslo o, si es necesario, en el deltoides. Sin embargo, la cantidad de los componentes en las composiciones proporcionadas a un paciente durante una administración se puede variar como sabe el experto en la materia. Asimismo, el adyuvante, si se utiliza, puede adaptarse al sistema de liberación.

Aunque se prefiere tener una única composición para la vacunación contra la tos ferina, el experto sabrá que el efecto de la invención como se describe en el presente documento también se puede obtener mediante la vacunación con los componentes de la vacuna aP, es decir, PT, FHA, FIM a una dosis humana de 12 a 100 µg, y, opcionalmente, PRN, en la que los componentes no están necesariamente todos en la misma composición, por ejemplo, en la que (parte de) la FIM está en una composición separada. Por ejemplo, una vacuna aP disponible en el mercado (que tiene FIM en una dosis de 0-5 µg por dosis humana) podría complementarse con la administración conjunta de FIM como un componente separado a una dosis total administrada de 12 a 100 µg, por ejemplo, 15-80 µg, 20-60 µg, 20-50 µg, o 20-25 µg de FIM, por ejemplo, mediante la inyección de una primera composición de vacuna aP que comprende PT, FHA, opcionalmente una dosis de 5 µg de FIM y, opcionalmente, PRN e inyectar una composición separada que comprende el (resto del) FIM para complementar a una dosis total de 12 a 100 µg, por ejemplo, 15-80 µg, 20-60 µg, 20-50 µg o 20-25 µg de FIM. En tales formas de realización, la administración

conjunta significa que las composiciones separadas se administran (por ejemplo, se inyectan) en el plazo de una hora, de preferencia en el plazo de unos pocos minutos entre las administraciones, preferentemente se administran esencialmente al mismo tiempo (por ejemplo, mediante inyección conjunta o mediante inyecciones consecutivas). Como alternativa, los compuestos podrían mezclarse justo antes de la administración, de modo que una sola inyección (con una composición que es una composición de acuerdo con la invención) es suficiente. Por tanto, la invención también proporciona un método para vacunar a un sujeto humano contra *Bordetella pertussis*, opcionalmente, una cepa de *Bordetella pertussis* negativa para PRN, que comprende administrar al sujeto los siguientes antígenos de *Bordetella pertussis*: toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y las fimbrias de los tipos 2 y 3 (FIM), y, opcionalmente, pertactina (PRN), en la que FIM se administra en una cantidad de 12-100 µg. En realizaciones preferidas, esto se realiza administrando una sola composición de acuerdo con la invención.

La invención se explica adicionalmente en los ejemplos siguientes. Los ejemplos no limitan la invención de ningún modo. Simplemente sirven para aclarar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Una dosis alta de FIM en una vacuna Ap5 mejora la protección contra *B. pertussis* negativo para PRN

Métodos:

Se usó un modelo validado de pulmón de ratón con *Bordetella pertussis*, que se correlaciona con la eficacia clínica de las vacunas aP (Guiso, 1999, Vaccine 17; 2366–2376; Denoel, 2005, Vaccine 23:5333–5341; Godfroid, 2004, Int. J. Med. Microbial. 294; 269–276) para analizar la eficacia de una vacuna de pertussis acelular de 5 componentes autorizada (ADACEL™, Sanofi Pasteur; en este ejemplo también denominada ap5) a un cuarto de una dosis humana con o sin la adición de 2 µg de antígeno FIM2/3 purificado (List Biological Laboratories Inc). Cada dosis de 0,5 ml de ADACEL™ contiene 5 Lf de toxoide del tétanos, 2 Lf del toxoide de la difteria y 5 antígenos de pertussis acelulares (2,5 µg de la toxina pertussis destoxificada, 5 µg de hemaglutinina filamentosa, 3 µg de pertactina y 5 µg de fimbrias de tipos 2 y 3) En resumen, se vacunó a ratones hembra Balb/c por vía subcutánea con aP5 con o sin antígeno FIM2/3 a las 4 y 7 semanas de edad a ¼ de la dosis humana. Por lo tanto, los animales recibieron 1,25 µg de FIM2/3 (grupo aP5) o 3,25 µg of FIM2/3 (grupo aP5 + FIM), que equivale a 5 µg y 13 µg en seres humanos, respectivamente. A las 9 semanas de edad, se expuso a los ratones por vía intranasal a ~10⁶ UFC *B. pertussis* OMS 18323 (una cepa positiva para pertactina), una cepa negativa para pertactina PRN-STOP y una cepa negativa para pertactina PRN-IS [Queenan, 2013, N Engl J Med. 368: 583–4]. A las 2 horas, 2 días, 5 días y 8 días después de la exposición (n = 5/grupo) se determinó la eliminación pulmonar contando las colonias de *B. pertussis* cultivadas en placa de agar Bordet-Gengou después de sembrar diluciones en serie de homogeneizado pulmonar.

Resultados:

El perfil del tiempo de la respuesta al tratamiento después de la vacunación con aP5 con o sin la adición de antígeno FIM2/3 se representa en la Figura 1. Para probar una diferencia estadísticamente significativa entre la media del log10 de los recuentos de UFC el día 5 y el día 8 entre ratones vacunados con aP5 o aP5 + FIM, se usó la prueba exacta de Wilcoxon. Además, los datos del perfil respuesta al tratamiento en el tiempo (desde el día 0 hasta el día 8) se modela mediante un análisis de la covarianza (Milliken GA et al. Analysis of Covariance, Dept of Statistics, Kansas State University, 1989.; SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Guide, Versión 6, Cuarta edición, Volumen 2. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989).

Para la cepa 18323 de OMS de *B. pertussis* (una cepa positiva para PRN, Fig. 1A), una comparación de la diferencia en log10 de los recuentos UFC el día 5 mediante el uso de una prueba no paramétrica exacta de Wilcoxon de un solo lado, mostró que la media del log10 de los recuentos UFC después de la vacunación con aP5 + FIM fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los de después de la vacunación con aP5 solo. La modelización de los datos del perfil de tiempo de respuesta de la muestra al tratamiento no mostró una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta al tratamiento desde el día 0 hasta el día 8 de un ajuste mediante un análisis de la covarianza con el día como un término para la pendiente y el día * día como un término para la curvatura cuadrática.

Después de la exposición con la cepa de *B. pertussis* PRN-STOP (Fig. 1B), una comparación de la diferencia en log10 de los recuentos UFC el día 5 mediante el uso de una prueba no paramétrica exacta de Wilcoxon de un solo lado, mostró que la media del log10 de los recuentos UFC después de la vacunación con aP5 + FIM fueron significativamente menores ($p < 0,02$) que los de después de la vacunación con aP5 solo. La modelización de los datos del perfil del tiempo de respuesta al tratamiento de la muestra no mostró una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta al tratamiento desde el día 0 hasta el día 8 de un ajuste por un modelo de análisis de la covarianza.

Para la cepa PRN-ES de *B. pertussis* (Fig. 1C), una comparación de la diferencia en log10 de los recuentos de UFC el día 5 indicó ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos de las vacunas mediante la prueba no paramétrica exacta de de Wilcoxon unilateral. El día 8 se observó una tendencia a que la media del log10 de los

recuentos UFC fueron más bajos después de la vacunación con aP5 + FIM en comparación con una media del log10 de los recuentos UFC después de la vacunación con aP5 solo ($P < 0,08$) mediante la prueba no paramétrica exacta de Wilcoxon. El análogo asintótico de la prueba exacta de Wilcoxon mostró una diferencia significativa de la vacuna el día 8 ($p < 0,03$). LA modelación de los datos del perfil del tiempo de la respuesta al tratamiento de la muestra sugirió una diferencia en la respuesta al tratamiento desde el día 0 hasta al día 8 del ajuste mediante un análisis de la covarianza con el día como un término para la pendiente y el día * día * trt como una curvatura cuadrática. Para analizar una diferencia en los efectos del tratamiento, un contraste lineal entre los perfiles de tratamiento desde el día 0 hasta el día 8 indicó que la media del log10 de los recuentos UFC después de la vacunación con aP5 + FIM fueron significativamente menores ($p < 0,01$) que los medidos después de la vacunación con aP5 solo. En resumen, estos resultados muestran que la adición de 2 µg de FIM2/3 a ¼ de una dosis humana de vacuna Adacel aumenta significativamente la eficacia de esta vacuna en un modelo de exposición de la nasofaringe de ratón contra un aislado de *B. pertussis* negativo para PRN. Este hallazgo es sorprendente, ya que no ha habido ninguna sugerencia anterior de que el aumento de la cantidad de FIM en una vacuna de la tosferina aumentaría su eficacia. Este resultado es especialmente relevante en el contexto de las cepas negativas para PRN que están surgiendo actualmente y que causan la enfermedad en todo el mundo.

Ejemplo 2. El aumento de la eficacia de la vacuna tras la adición de FIM en el modelo de exposición de ratón depende de la dosis.

Métodos:

Para investigar si un aumento de la dosis de FIM se correlacionaba con el aumento de la eficacia de la vacuna, lo que sugeriría que el efecto es específico de FIM, se usó el modelo validado de exposición pulmonar a *Bordetella pertussis* como se ha descrito anteriormente. Se vacunó a los animales con 1/10 de la dosis humana de una vacuna aP de 2 componentes autorizada (PENTAVAC®, Sanofi Pasteur MSD; vacuna a la que en adelante en el presente documento se hace referencia como aP2) con o sin la adición de FIM2/3 (List Biological Laboratories Inc; material al que también se conoce como FIM). Cada dosis humana de 0,5 ml de PENTAVAC® contiene: (al menos) 30 UI del toxoide del tétanos (TT), (al menos) 30 UI del toxoide de la difteria (DT); 40, 8 y 32 unidades de antígeno D del poliovirus inactivado (IPV) tipos 1, 2 y 3, respectivamente; 10 µg del polisacárido de tipo B de *H. Influenzae* conjugado a TT (Hib-TT); y 2 antígenos de pertussis acelular (25 µg de la toxina de pertussis destoxificada (PT) y 25 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA)). Una cantidad de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 o 5,0 µg de FIM, correspondientes a 5, 10, 15, 20, 25 o 50 µg de FIM por dosis humana, respectivamente, se adsorbió a hidróxido de aluminio y se coadministró (como inyección separada) con la vacuna aP2 autorizada (imitando de este modo a una vacuna aP con dosis alta de FIM de acuerdo con la invención). A las 9 semanas de edad, se expuso a los ratones por vía intranasal a $\sim 10^6$ UFC de una cepa de *B. pertussis* negativa a PRN (I195). A las 2 horas ($n = 5$ /grupo) y 5 días ($n = 10$ /grupo) se determinó la eliminación pulmonar contando las colonias de *B. pertussis* cultivadas en placa de agar Bordet-Gengou después de sembrar diluciones en serie de homogeneizado pulmonar.

Resultados:

Se observó una disminución dependiente de la dosis del número de colonias de *B. pertussis* cultivadas a partir de los pulmones de los ratones vacunados con una cantidad creciente de FIM. De un modo similar, se observó una disminución dependiente de la dosis del número de colonias de *B. pertussis* cultivadas a partir de los pulmones de los ratones vacunados en ratones vacunados con una dilución 1/25 y cantidades crecientes de FIM. La figura 2 muestra el log10 de recuentos UFC obtenidos de los pulmones de ratones vacunados con 1/10 de la dosis humana de aP2 en presencia de una cantidad creciente de FIM, 5 días después de la exposición a la cepa I195 de *B. pertussis*. En la Tabla 1 se muestra el log10 de los recuentos UFC y los valores p calculados utilizando Mann-Whitney (GraphPad Prism) comparando la media del log10 de los recuentos UFC después de la vacunación con aP2 a 1/10 de la dosis humana con o sin FIM. Después de la adición de 2 µg o más de FIM a 1/10 de la dosis humana de aP2 (dosis humana equivalente de 20 µg), la eficacia de la vacuna se incrementó significativamente.

Conclusión:

El efecto dependiente de la dosis de una dosis creciente de FIM sobre la eficacia de la vacuna demuestra que este efecto es específico de FIM. Además, las vacunas que incluyen una dosis alta de FIM son más eficaces que una vacuna que contiene la cantidad máxima cantidad de FIM presente en las vacunas aP5 actualmente disponibles en el mercado (5 µg por dosis humana). Esto es coherente con los hallazgos en el ejemplo 1, que mostraron que el aumento de la dosis de FIM en la vacuna aP por encima de 10 µg por dosis humana mejoró la eficacia y amplía aún más los hallazgos a una vacuna aP diferente y una cepa de pertussis adicional negativa para PRN.

Ejemplo 3. Aumento de la eficacia de una vacuna fórmula aP5 con la adición de FIM se observa frente a múltiples cepas de *B. pertussis*.

Métodos:

El modelo validado de exposición pulmonar de ratón a *Bordetella pertussis* como se ha descrito anteriormente se

utilizó para investigar si un aumento de la dosis de FIM mejoró la eficacia de la vacuna contra una variedad de cepas de *B. pertussis*. Se usó un 1/10 de la dosis humana de ADACEL® (Sanofi Pasteur; que contiene 2,5 µg de PT, 5 µg de FHA, 3 µg de PRN y 5 µg de FIM2/3 por dosis humana, véase también el Ejemplo 1; en el presente documento se hace referencia como aP5) o BOOSTRIX® (GlaxoSmithKline Biologicals; que contiene 5 Lf del toxoide del tétanos, 2,5 Lf del toxoide de la difteria, 8 µg de PT, 8 µg de FHA y 2,5 µg de PRN por dosis humana; en adelante en el presente documento denominado aP3), con o sin la adición (como inyección separada después de la adsorción a hidróxido de aluminio) de 5 µg de FIM (List Biological Laboratories Inc), correspondiente a 50 µg por dosis humana. Los animales vacunados a las 4 y 7 semanas de edad se expusieron a las 9 semanas de edad a una de las siguientes cepas de *B. pertussis*: OMS 18323 (positiva para PRN), 24422 (negativa para PRN), 24421 (negativa para PRN) o I195 (negativa para PRN). A las 2 horas (n = 5/grupo) y 5 días (n = 10/grupo) se determinó la eliminación pulmonar contando las colonias de *B. pertussis* cultivadas en placa de agar Bordet-Gengou después de sembrar diluciones en serie de homogeneizado pulmonar.

Resultados:

La adición de 5 µg de FIM a 1/10 de dosis humana aP5 mejoró la eficacia de la vacuna contra todas las cepas de *B. pertussis*, que alcanzó significación estadística frente a 3 de las cepas de pertussis analizadas (OMS 18323 (p = 0,04), PRN-24421 (p = 0,03) y PRN-I195 (p = 0,001)) (Figura 3, Tabla 2).

Este experimento también se realizó utilizando aP3 (1/10 de dosis humana). Para tres de las cepas de exposición (OMS 18323, 24422 y 24421) no se observó una reducción después de la adición de FIM con esta vacuna aP3 (BOOSTRIX®), aunque esto posiblemente podría explicarse en parte por la ya elevada eficacia observada para estas cepas de exposición con aP3 en particular cuando se administra sin FIM. Sin embargo, se observó una reducción significativa en el log10 de los recuentos UFC con la adición de FIM a este aP3 cuando se expone a la cepa I195 de *B. Pertussis*.

En general, estos datos indican que una vacuna con una dosis alta de FIM tendría una eficacia mejorada contra una serie de cepas de pertussis.

Conclusiones:

El aumento de la eficacia observada después de la inmunización con un alto nivel de FIM en combinación con una vacuna aP5 disponible en el mercado frente a un panel de cepas de *B. pertussis* indica que se observa el beneficio de una dosis alta de FIM también contra diferentes cepas de pertussis. Por lo tanto, las vacunas que incluyen una dosis alta de FIM de acuerdo con la invención pueden contribuir a la disminución de la tasa de la enfermedad pertussis.

Ejemplo 4. Aumento de la eficacia con la adición de FIM para diferentes vacunas aP métodos actualmente disponibles en el mercado.

Métodos:

El modelo validado en ratón de exposición pulmonar a *Bordetella pertussis* pulmonar como se ha descrito anteriormente se usó para investigar si un aumento de la dosis de FIM (List Biological Laboratories Inc.) mejoró eficacia de la vacuna ADACEL® (Sanofi Pasteur, que contiene 2,5 µg de PT, 5 µg de FHA, 3 µg de PRN y 5 µg de FIM 2 + 3 como componentes de aP por dosis humana), PENTAVAC® (Sanofi Pasteur MSD, que contienen 25 µg de PT y 25 µg de PT y 25 µg de FHA como componentes de aP por dosis humana) o BOOSTRIX® (GlaxoSmithKline Biologicals; que contienen 8 µg de PT, 8 µg de FHA y 2,5 µg de PRN como componentes aP por dosis humana). Se vacunó a los ratones con 1/10 de dosis humana a las 4 y 7 semanas de edad, con o sin la adición de 5 µg de FIM a la vacuna comercial (correspondiente a 50 µg de FIM añadido por dosis humana), expuestos a las 9 semanas de edad a la cepa I195 negativa a pertactina de *B. pertussis* y se determinó la eliminación pulmonar 5 días después de la exposición (n = 10/grupo) contando las colonias de *B. pertussis* cultivadas en placas de agar Bordet-Gengou.

Resultado:

Para las tres vacunas, la adición de FIM dio como resultado una media del log10 de los recuentos UFC significativamente en comparación con la media del log10 de los recuentos UFC después de la vacunación con la vacuna comercial solo (Tabla 3).

Conclusión:

La eficacia de la vacuna de las tres vacunas mejoró significativamente después de la adición de FIM. Esto sugiere que el efecto de FIM se puede generalizar a una serie de vacunas aP comerciales que contienen diferentes cantidades de antígenos de pertussis y diferentes cantidades de FIM. La eficacia de las vacunas que ya incluyen FIM (ADACEL®) o aquellos que no incluyen FIM (PENTAVAC® o BOOSTRIX®) mejora, lo que muestra que no es solo presencia de FIM que contribuye a la eficacia de la vacuna, sino también la dosis de FIM es importante.

Ejemplo 5. Aumento de la funcionalidad del anticuerpo anti-FIM después de la vacunación con una dosis alta de FIM contra una amplia gama de cepas de pertussis.

La actividad funcional de los anticuerpos contra los componentes de pertussis se han identificado como importantes parámetros adicionales a tener en cuenta, en particular, en la evaluación de nuevas formulaciones que contienen PT y FIM que se sabe que inducen anticuerpos con actividad funcional, tal como neutralización de toxinas y aglutinación bacteriana, respectivamente. Se han establecido ensayos para medir los anticuerpos aglutinantes de *B. pertussis* de células enteras. Aunque no existe un umbral funcional que se haya encontrado que se correlaciona directamente con la eficacia protectora de las vacunas de la tosferina, son, sin embargo, un parámetro inmunológico importante para determinar como parte de la comparación general de nuevas formulaciones de vacunas con los que se ha demostrado que son seguros y eficaces (del borrador de la OMS Recomendaciones para vacunas aP, OMS/BS/2011,2158, sección C.2,1.2). Por lo tanto, dada la importancia de este tipo de ensayos para las vacunas que contienen FIM, se utilizó un ensayo de aglutinación para poner a prueba aún más las vacunas de la invención contra varias cepas de *B. pertussis*.

Métodos:

Se recogió el suero de los ratones que fueron vacunados a las 4 y 7 semanas de edad con 1/10 de dosis humana de PENTAVAC® (Sanofi Pasteur MSD; que contiene como antígenos aP 25 µg de PT y 25 µg de FHA por dosis humana; denominada en el presente documento aP2) con o sin la adición de FIM (List Biological Laboratories Inc). Una cantidad de 0,5 o de 2,0 µg de FIM, correspondiente a 5 o 20 µg de FIM por dosis humanos, respectivamente, se adsorbió a hidróxido de aluminio y se administró conjuntamente (como una inyección separada) con la vacuna de aP2 disponible comercialmente. A la semana 9, se sacrificó a 5 animales por grupo de dosificación y los sueros aislados de hemorragias terminales se agruparon para la investigación de los niveles de anticuerpos anti-FIM (funcionales). Para evaluar las respuestas de anticuerpos funcionales a FIM, se realizó un ensayo de aglutinación. En este ensayo, la presencia de anticuerpos funcionales en el suero de prueba conduce a la formación de complejos de antígeno/anticuerpo cuando se mezcla con *B. pertussis*. La aglutinación positiva se define como la presencia de una solución opaca en el pocillo, debido a la presencia de complejos anticuerpo/antígeno. Se observa aglutinación negativa, definida como un sedimento bacteriano en la parte inferior del pozo. En resumen, 50 µl de suero de ensayo se diluyeron en serie en PBS y se mezclaron con 50 µl de una suspensión de *B. pertussis* de una DO₆₀₀ de 1,0. Esta mezcla se incubó durante la noche y al día siguiente se determinó la presencia o ausencia de un sedimento bacteriano utilizando un espejo invertido. El título de aglutinación se define como la dilución más alta que da como resultado la aglutinación completa.

Para investigar si los anticuerpos anti-FIM inducidos por la vacunación de los ratones eran funcionales contra un panel de cepas de *B. pertussis*, se ensayó si los sueros tenían la capacidad de aglutinar a 10 cepas diferentes de pertussis que expresan FIM. De un panel de 30 aislados clínicos recientes de *B. pertussis* (amablemente proporcionados por el Dr. Alan Evangelista, Hospital St. Christopher para Niños en Filadelfia), 24 aislamientos mostraron lecturas de aglutinación claras con un anticuerpo monoclonal anti-FIM comercial control positivo (06/128, NIBSC, UK), lo que confirma que estas cepas expresan el antígeno FIM. Desde este panel de 24 cepas, 5 cepas negativas a PRN y 5 cepas positivas a PRN se seleccionaron para probar el suero de ratón.

Resultados:

La vacunación en presencia de FIM indujo títulos de anticuerpos funcionales. Se observó aglutinación positiva con todos los 6 grupos de suero de ratón de ratones vacunados en presencia de FIM contra los 10 cepas de *B. pertussis*. El grupo control no vacunado y el grupo que recibió aP2 en 1/10 de dosis humana solo, que no incluye FIM, no mostraron aglutinación alguna (Tabla 4). Aunque se demostró una dosis alta de FIM ETA más eficaz que una dosis baja de FIM en el modelo validado de exposición pulmonar de *Bordetella pertussis* de ratón (ejemplo 2), no hubo correlación dosis-respuesta FIM claro (datos no presentados para otras dosis FIM), que es probablemente debido a la limitación de este ensayo estandarizado de la OMS, que no es lo suficientemente sensible como para detectar pequeñas diferencias en la aglutinación.

Conclusión:

Vacunación con una vacuna comercial en presencia de FIM da lugar a la inducción de anticuerpos funcionales contra un amplio panel de cepas de *B. pertussis*, o cepas negativas a PRN o positivas a PRN. Este hallazgo indica que una vacuna que incluye una alta dosis de FIM sería eficaz en la reducción de la enfermedad de la tos ferina causada por una amplia gama de cepas de *B. pertussis*.

Tabla 1. Efecto sobre la protección de la adición de dosis crecientes de FIM a la vacuna aP2

	Cantidad total de FIM*	Dosis humana equivalente de FIM	Media del Log10 UFC	Valor p frente a aP2
Control	–	–	7,2	0,0002
aP2	–	–	2,9	–

	Cantidad total de FIM*	Dosis humana equivalente de FIM	Media del Log10 UFC	Valor p frente a aP2
aP2 + 0,5 µg FIM	0,5 µg	5 µg	3,5	0,3418
aP2 + 1,0 µg FIM	1,0 µg	10 µg	2,1	0,0514
aP2 + 1,5 µg FIM	1,5 µg	15 µg	2,5	0,5390
aP2 + 2,0 µg FIM	2,0 µg	20 µg	2,0	0,0164
aP2 + 2,5 µg FIM	2,5 µg	25 µg	1,6	0,0013
aP2 + 5,0 µg FIM	5,0 µg	50 µg	1,4	0,0001

Tabla 1: Valores P determinados utilizando la prueba de Mann-Whitney, de comparación de la diferencia en la media de log10 de recuentos UFC del pulmón en ratones expuestos a la cepa I195 de *B. Pertussis* negativa para PRN la semana 9 después de la vacunación con aP2 a 1/10 de la dosis humana con la adición de FIM frente aP2 solo administrada a 1/10 de la dosis humana a las 4 y 7 semanas de edad. Para más detalles véase el ejemplo 2.

Tabla 2. Efecto de la adición de la FIM a la vacuna aP5 sobre la protección frente a diferentes cepas

Cepa	aP5			aP5 + FIM			Valor p
	Cantidad total de FIM (µg)	Dosis humana equivalente de FIM (µg)	Media del Log10 UFC	Cantidad total de FIM (µg)	Dosis humana equivalente de FIM (µg)	Media del Log10 UFC	
OMS 18323	0,5	5	4,0	5,5	55	3,3	0,04
24422	0,5	5	4,6	5,5	55	3,6	0,08
24421	0,5	5	4,5	5,5	55	3,8	0,03
I195	0,5	5	5,3	5,5	55	4,0	0,001

Tabla 2: Media del log10 de los recuentos UFC del pulmón en ratones 5 días después de la exposición a 4 cepas diferentes de *B. pertussis* a las 9 semanas de la vacunación con aP5 a 1/10 de la dosis humana con o sin la adición de 5 µg de FIM a las 4 y 7 semanas de edad. Valores P determinados utilizando la prueba de Mann-Whitney. Para detalles, véase el ejemplo 3.

Tabla 3. Efecto de la adición de FIM a diferentes vacunas comerciales aP

	Cantidad total de FIM (µg)	Dosis humana equivalente de FIM (µg)	Media del Log10 UFC	Valor p
ADACEL®	0,5	5	5,3	
ADACEL® + FIM	5,5	55	3,94	0,001
PENTAVAC®	0	0	2,89	
PENTAVAC® + FIM	5	50	1,38	0,0001
BOOSTRIX®	0	0	4,1	
BOOSTRIX® + FIM	5	50	2,87	0,004

Tabla 3: Media del log10 de los recuentos UFC del pulmón en ratones 5 días después de la exposición a la cepa I195 de *B. pertussis* a las 9 semanas de la vacunación con 3 cepas diferentes de aP autorizadas a 1/10 de la dosis humana con o sin la adición de 5 µg de FIM a las 4 y 7 semanas de edad. Valores P determinados utilizando la prueba de Mann-Whitney. Para detalles, véase el ejemplo 4.

Tabla 4. Actividad funcional de anticuerpos contra diversas cepas mediante la adición de FIM a la vacuna aP2

	Cantidad total de FIM (µg)	Dosis humana equivalente de FIM (µg)	Nivel de anticuerpos frente a AFIM	Aglutinación contra las cepas negativas para PRN					Aglutinación contra las cepas positivas para PRN						
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
N.º de cepa															
Control	—	—	<		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
aP2	—	—	<		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
aP2 + 0,5 µg FIM	0,5	5,0	193		480	480	480	480	320	320	200	480	320	320	320
aP2 + 2,0 µg FIM	2,0	20	285		960	960	960	960	960	960	640	960	640	800	800
< : Por debajo del límite de detección (DLD)															

Tabla 4: Niveles de anticuerpos anti-FIM y títulos de aglutinación contra un panel de cepas de *B. pertussis* determinados en mezclas de sueros recogidos de 5 ratones por grupo vacunados a las 4 y 7 semanas de edad con 1/10 de la dosis humana de aP2 con o sin la adición de FIM. Véanse detalles en el ejemplo 5.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna acelular contra la tosferina (aP) que comprende los antígenos de *B. Bordetella pertussis*, toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y los tipos de fimbrias (FIM) 2 y 3, y, opcionalmente, pertactina (PRN), en la que FIM está presente en una cantidad de 12–100 µg por dosis humana.
2. Una composición de aP de acuerdo con la reivindicación 1, en la que FIM está presente en una cantidad de 15–60 µg por dosis humana.
3. Una composición de aP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que FIM está presente en una cantidad de 20–60 µg por dosis humana.
4. Una composición de aP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que FIM está presente en una cantidad de 20-50 µg por dosis humana.
5. Una composición de aP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que FIM está presente en una cantidad de 20-25 µg por dosis humana.
6. Una composición de vacuna aP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende pertactina (PRN).
7. Una composición de vacuna aP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el PT está destoxificado genéticamente.
8. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende antígenos de uno o más patógenos distintos de *B. pertussis*.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende el toxoide del tétanos y el toxoide de la difteria.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende uno o más de:
 - a) un conjugado de oligosacárido o polisacárido de *Haemophilus influenzae* (Hib);
 - b) el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg); y
 - c) el virus de la polio inactivado (IPV).
11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un adyuvante.
12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el adyuvante comprende hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o una combinación de los mismos.
13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1–12 para su uso en la vacunación de un sujeto contra *Bordetella pertussis*.
14. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1–12, para su uso en la protección de un sujeto frente a la tos ferina causada por la infección con una cepa de *Bordetella Pertussis* negativa para PRN.
15. Una composición que comprende los antígenos de *Bordilla pertussis* el toxoide de pertussis (PT), la hemaglutinina filamentosa (FHA) y los tipos 2 y 3 de fimbrias (FIM), y, opcionalmente, pertactina (PRN), para su uso en la vacunación de un sujeto humano contra *Bordetella pertussis*, opcionalmente una cepa negativa para PRN de *Bordetella pertussis*, mediante la administración de dichos antígenos de *Bordetella pertussis* al sujeto, en el que FIM se administra en una cantidad de 12–100 µg.

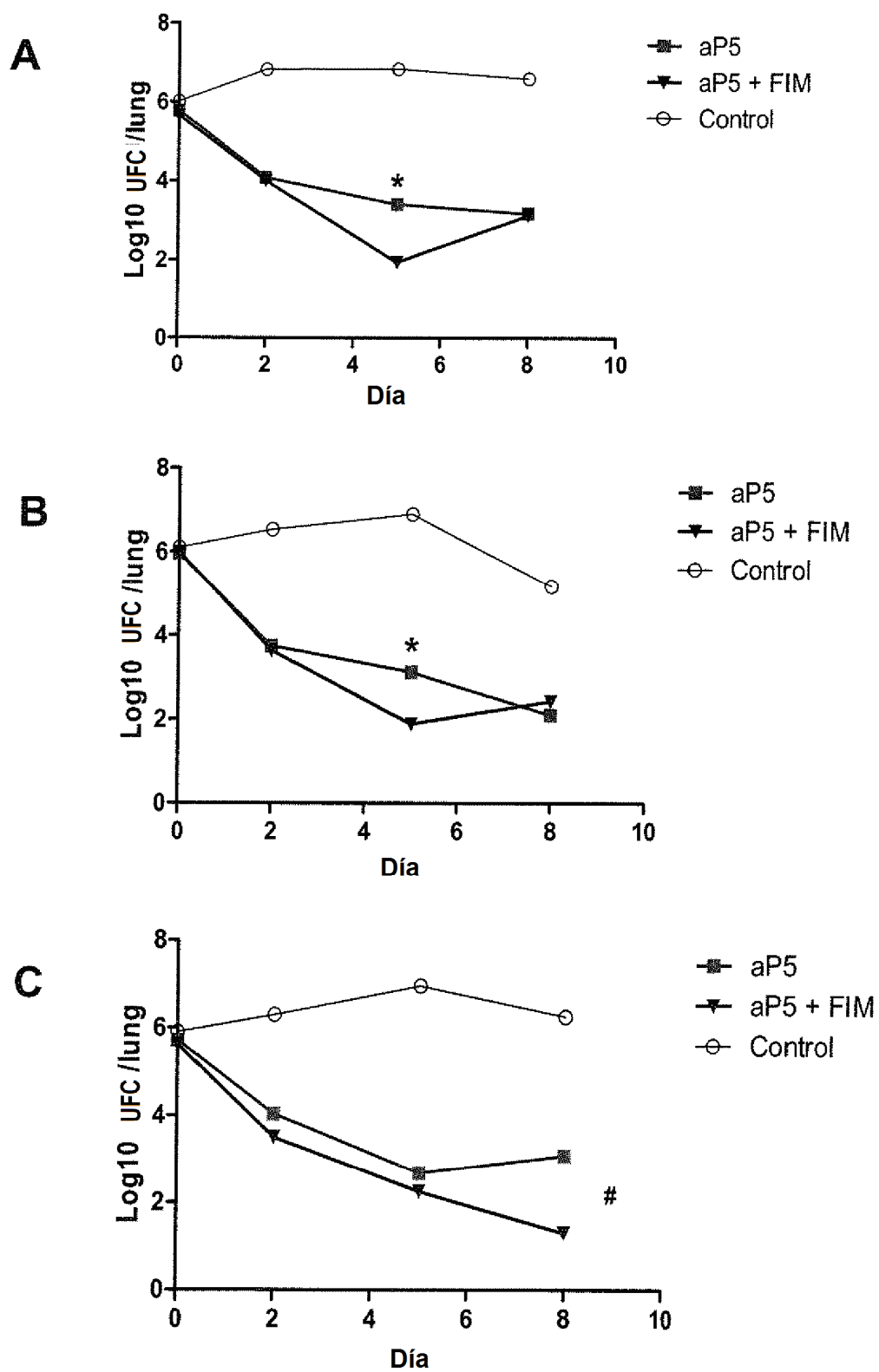


FIG. 1

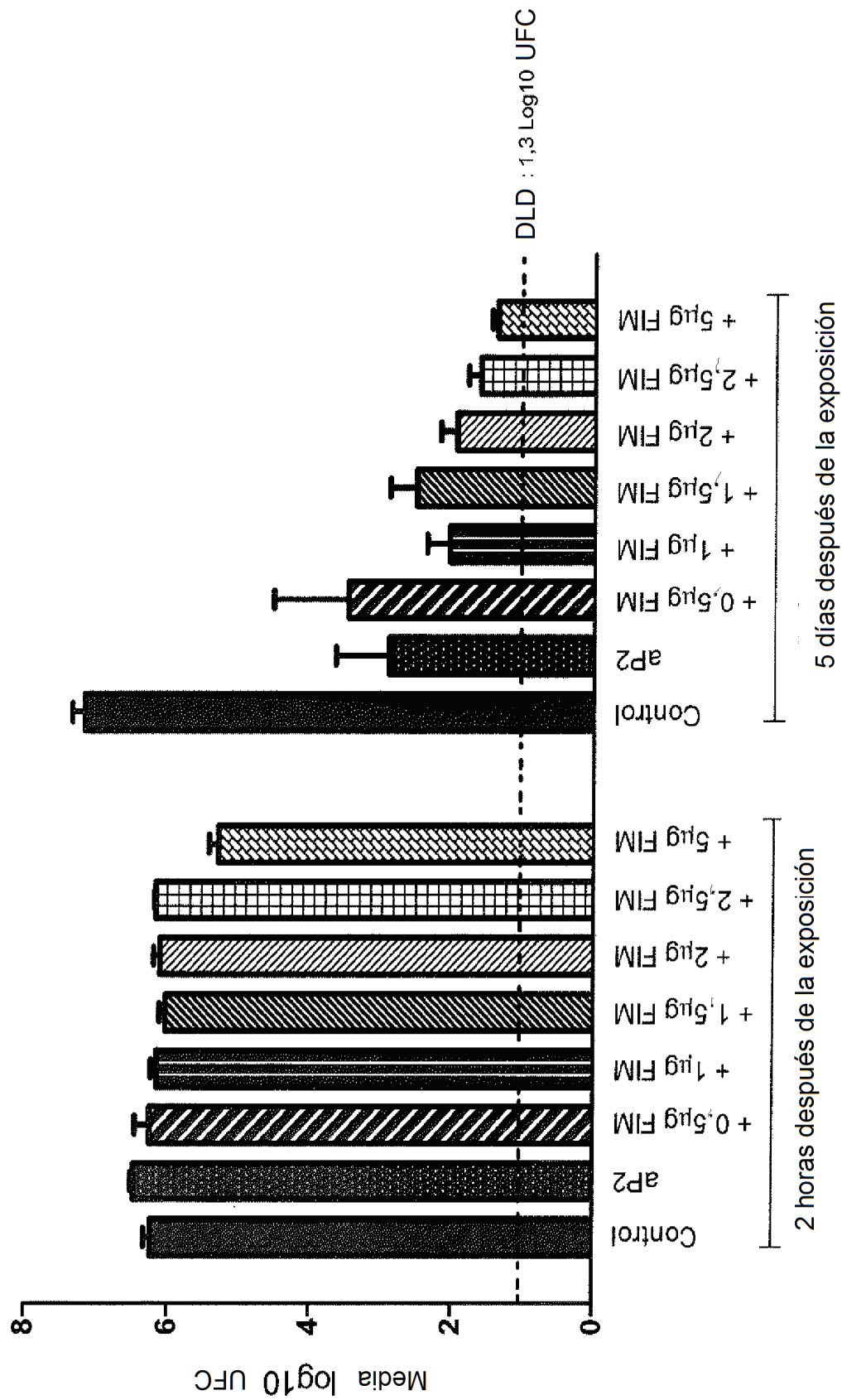


FIG. 2

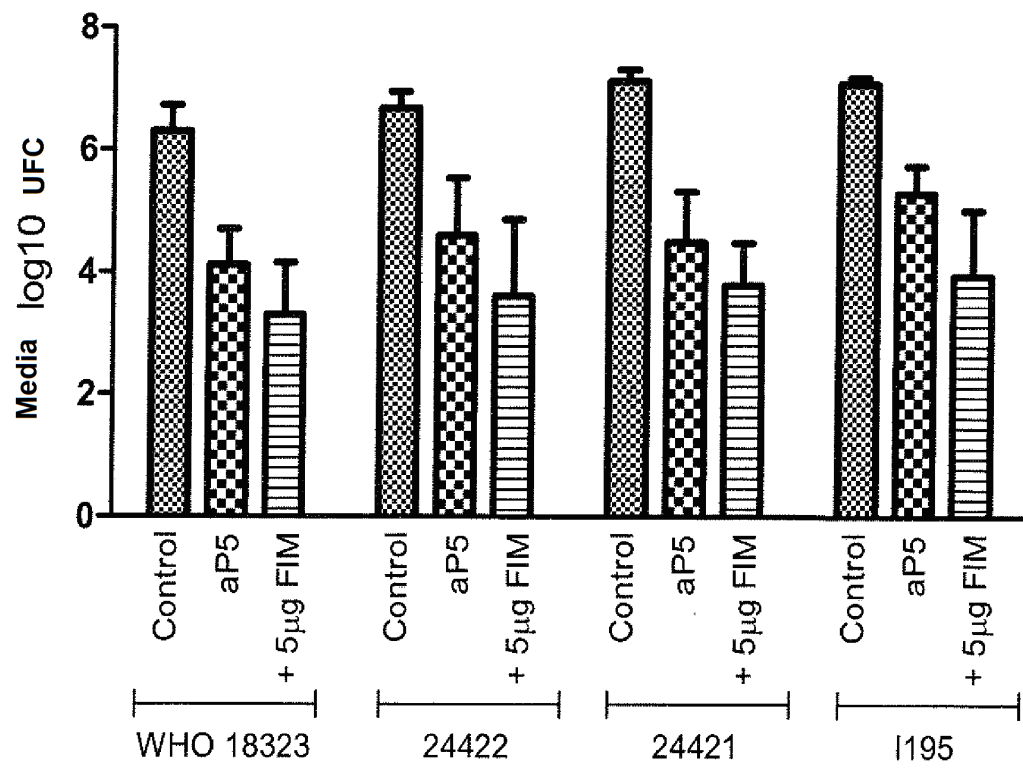


FIG. 3