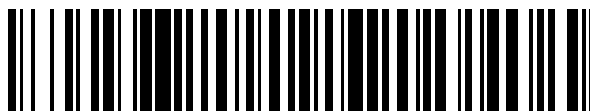


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 242**

51 Int. Cl.:

C07K 14/255 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2009** **PCT/GB2009/002159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010** **WO2010029293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2009** **E 09785078 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016** **EP 2324051**

54 Título: **Vacunas de Salmonella no tifoidea**

30 Prioridad:

09.09.2008 GB 0816462

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**GSK VACCINES INSTITUTE FOR GLOBAL
HEALTH S.R.L. (100.0%)
Via Fiorentina 1
53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:

CUNNINGHAM, ADAM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 617 242 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

Vacunas de Salmonella no tifoidea

Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas contra las infecciones por Salmonella no tifoidea (NTS), en particular a la provisión en dichas vacunas de un inmunógeno que generará anticuerpos que se dirijan a la proteína de la membrana externa porina (OmpD). Preferentemente, por ejemplo, esta puede ser la propia OmpD o un fragmento de OmpD que mantenga la capacidad para inducir anticuerpos eficaces contra NTS, especialmente el serovar Typhimurium de *Salmonella enterica* - al que se hace referencia posteriormente como STm. Dicho polipéptido puede proporcionarse en combinación con una molécula de excipiente adyuvante. Se puede proporcionar como parte de una vacuna multi-subunitaria con uno o más de otros antígenos derivados de Salmonella.

Antecedentes de la invención

El serovar Typhi de *Salmonella enterica* (*S. typhi*), *Salmonella paratyphi* A y las salmonellas no tifoideas (NTS) son la causa principal de enfermedades. Mientras la fiebre tifoidea sigue siendo un problema de salud pública mundial, en algunas regiones tales como el África sub-sahariana las enfermedades por serovares no tifoideos de *Salmonella enterica*, principalmente Typhimurium aunque también se incluye Enteritidis, son particularmente preocupantes como causa que da lugar a mortalidad en niños y adultos con VIH. Esto es completamente distinto a las infecciones por NTS en Occidente que producen primariamente una gastroenteritis auto-limitante cuyo impacto es como mucho simplemente de importancia económica.

La Salmonella coloniza los macrófagos y la resolución de la fase intracelular de la infección está controlada por linfocitos T CD4 efectores que interactúan con los fagocitos infectados. Sin embargo, está bien reconocido que la muerte por infección con NTS habitualmente se asocia con bacteriemia y hay muchas pruebas de que la bacteriemia se produce en individuos que carecen de anticuerpos específicos que limiten la diseminación extracelular y el crecimiento de NTS (por ejemplo, MacLennan, J. Clin. Invest. (2008) 118:1553). Por lo tanto, se ha expuesto que las infecciones por NTS producen una bacteriemia progresiva en adultos VIH⁺ y niños, muriendo alrededor del 50 % de los individuos infectados. Adicionalmente, en el África sub-sahariana, las infecciones por NTS producen una enfermedad mortal en niños no VIH⁺, principalmente entre 6 y 24 meses, que se iguala o sobrepasa al impacto de la enfermedad por neumococos. De nuevo, la gravedad de la enfermedad en dichos niños infectados por NTS se asocia estrechamente con bacteriemia; la mortalidad asociada con dicha bacteriemia infantil es aproximadamente del 25 % en los que alcanzan el estado clínico. La susceptibilidad de dichos niños se correlaciona con la pérdida de anticuerpos maternos y la falta de inmunidad adquirida activamente contra Salmonella.

Aunque se utilizan vacunas para prevenir la fiebre tifoidea producida por *S. typhi*, la vacunación contra la fiebre tifoidea no parece inducir una protección cruzada contra STm. En algunos casos, esto se debe claramente a la presencia diferencial de antígenos (por ejemplo como con el uso del antígeno Vi), pero dicha falta de protección cruzada se puede extender también a vacunas de bacterias inactivadas o atenuadas. Actualmente no existen vacunas o medidas preventivas contra NTS. Los antibióticos tales como las fluoroquinolonas se utilizan ampliamente para tratar las infecciones por Salmonella, pero la aparición de cepas de Salmonella resistentes a múltiples fármacos (MDR) es un problema creciente y también que su administración puede ser demasiado tarde tras la presentación para ser eficaces. Por lo tanto existe la necesidad real de un medio preventivo eficaz para combatir la infección por NTS.

Los inventores expusieron anteriormente que la STm induce una respuesta de anticuerpos atípica en los ratones que se caracteriza por la rápida y masiva expansión de células plasmáticas extra-foliculares. La inducción de esta respuesta es independiente de linfocitos T, aunque la activación de la respuesta de IgG2a es dependiente de la ayuda de linfocitos T CD4. Estos estudios también identificaban que la respuesta activada precoz de anticuerpo se dirigía a antígenos en la membrana externa de STm (Cunningham y col. (2007) J. Immunol. 178, 6200-6207). Otros autores han expuesto que las preparaciones de porina aislada de la cepa de Salmonella tifoidea serovar Typhi de *Salmonella enterica* (*S. typhi* o ST) también inducen una respuesta de anticuerpo atípicamente de larga duración en ratones (Secundino y col. (2005) Immunology, 117, 59-70). Este trabajo demostraba que las porinas de membrana externa tanto OmpF como OmpC contribuyen a la respuesta de anticuerpo siendo la OmpC la principal proteína responsable. Sin embargo, la composición de proteína de membrana externa (Omp) de las membranas externas de ST y STm son diferentes y dicho trabajo con ST no es aplicable directamente a STm. Además, Secundino y col. exponen que el suero anti-porina de *S. typhi* no reaccionaba de manera cruzada con STm.

En la membrana externa de STm, pero no en la de *S. typhi*, hay una tercera porina, OmpD, además de OmpF y OmpC. La OmpD es una porina trimérica que comparte un grado de homología con OmpF y OmpC, primariamente en la estructura en barril. Mientras que la expresión de OmpF y OmpC se regula por OmpR y es sensible a un cambio en la osmolaridad, la expresión de OmpD aumenta en anaerobiosis y se suprime al descender el pH. Singh y col. previamente miraron la capacidad de los anticuerpos monoclonales contra porinas de STm para proporcionar una inmunoprotección pasiva contra STm en ratones (Microbial Pathogenesis (1996) 21, 249-263). No se encontró ningún anticuerpo monoclonal contra los epítopos de OmpC y OmpD expuestos en la superficie que protegiera

contra la infección por STm. Se descubrió que una mezcla de dichos anticuerpos solamente extendía el tiempo de supervivencia de ratones desafiados con membrana externa de STm purificada. Sin embargo, esto representa un repertorio de anticuerpos muy diferente de la respuesta de anticuerpo contra STm *in vivo* y no proporciona información en la contribución de cualquier porina individual de STm a la respuesta de anticuerpo frente a la infección por STm.

El documento WO 2007/062795A (Stifung Tierarztliche Hochschule Hannover), Selke y col. ("Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction of a protective efficacy of salmonella enterica serovar typhimurium live negative-marker vaccine" Infection Immun: Vol. 75 pp 2476-2483, 2007) y Can J Microbiol ("OmpD but not OmpC is involved in adherence of salmonella enterica serovar typhimurium to human cells " Vol. 50, pp 719-727, 2004) proporcionan visiones útiles de los antecedentes de la presente invención.

Sorprendentemente, los inventores han demostrado ahora que la respuesta natural de anticuerpo a OmpD en STm es suficiente para conseguir reducciones marcadas en el número de células bacterianas STm. Una preparación altamente purificada de Omp de STm que contenía las porinas OmpD, OmpC y OmpF demostraba que inducía una rápida respuesta de anticuerpo específica contra porina proteica en ratones deficientes en linfocitos T asociada con la inducción de una población de linfocitos B1b innatos; se demostró que la inmunización con dichas Omp aisladas producía respuestas protectoras equivalentes contra la infección de STm, a las de STm inactivadas. Sin embargo, en los ratones inmunizados con porina infectados con STm OmpD se eliminaba la protección y los anticuerpos de los ratones inmunizados con porina se unían deficientemente con preparaciones de pared celular deficientes en OmpD. Además, se demostró que las preparaciones de Omp de *S. typhi* no protegían de manera cruzada a pesar de la alta homología entre las porinas OmpC y OmpF de ST y STm. Esto es consistente con el importante papel de los anticuerpos contra OmpD para combatir la infección por NTS. Por lo tanto, los inventores han demostrado ahora que la OmpD es un primer candidato para una subunidad de vacuna contra NTS.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona por lo tanto un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:

- (i) un polipéptido que es una OmpD de Salmonella no tifoidea, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad de generar una respuesta de anticuerpo contra Salmonella no tifoidea (NTS); o
- (ii) una variante de un polipéptido como se define en (i) que tiene dicha capacidad, para su uso en terapia.

El polipéptido inmunogénico puede comprender:

- (i) un polipéptido que es una OmpD o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad para generar una respuesta de anticuerpo contra NTS, especialmente *S. typhimurium* (STm); o
- (ii) una variante de un polipéptido como se define en (i) que tiene dicha capacidad,

para su uso en terapia (terapia preventiva o tratamiento), más particularmente para su uso en el tratamiento o prevención de la infección y/o la enfermedad por NTS, especialmente la infección y/o enfermedad o STm o *S. enteritidis*. Preferentemente, dicho polipéptido inmunogénico puede ser la OmpD nativa de Salmonella no tifoidea, por ejemplo, la OmpD que se deriva de STm, o un fragmento inmunogénico de la misma. Las variantes adecuadas incluyen tanto las variantes naturales como los análogos modificados que mantengan la especificidad de anticuerpo deseada.

También se proporciona el uso de un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:

- (i) un polipéptido que es una OmpD o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad de generar una respuesta de anticuerpo contra NTS, especialmente STm; o
- (ii) una variante de un polipéptido como se define en (i) que tiene dicha capacidad,

para su uso en la fabricación de una composición vacunal para el tratamiento o prevención de la infección y/o enfermedad por NTS tal como la infección y/o enfermedad por STm. Preferentemente la composición vacunal será eficaz contra STm y *S. enteritidis*. Se pueden emplear uno o más polipéptidos inmunogénicos junto con el polipéptido que se define en (i) o (ii) anteriormente, por ejemplo, que se seleccionan de entre (i) las porinas de la membrana externa de NTS y/o ST y/o *S. paratyphi* o fragmentos inmunogénicos de las mismas.

En otro aspecto, se proporciona una composición vacunal que proporciona un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:

- (i) un polipéptido que es una OmpD de una Salmonella no tifoidea, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad para generar una respuesta de anticuerpo contra una Salmonella no tifoidea (NTS); o
- (ii) una variante de polipéptido como se define en (i) que tiene dicha capacidad,

en el que la composición vacunal comprende además uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición vacunal que proporciona un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:

- 5 (i) un polipéptido que es una OmpD de una *Salmonella* no tifoidea, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad para generar una respuesta de anticuerpo contra una *Salmonella* no tifoidea (NTS); o
- (ii) una variante de un polipéptido como se define en (i) que tiene dicha capacidad,

y que incluye un adyuvante. El componente antigénico de dicha vacuna puede comprender o consistir en dicho polipéptido antigénico. El adyuvante puede estar separado de este antígeno o se proporciona en una proteína de fusión conjugada con el polipéptido que se define en (i) o (ii) anteriormente, por ejemplo, se puede proporcionar la OmpD conjugada con toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, toxoide de cólera u otro excipiente

- 10 adyuvante polipeptídico. Como se ha indicado anteriormente, dicha composición vacunal puede incluir otros antígenos para extender su amplitud espectro, por ejemplo para proporcionar una vacuna de amplio espectro tanto para NTS como para las *Salmonellas* causantes de fiebre tifoidea.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición vacunal como se ha definido anteriormente para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir la infección por NTS, especialmente la infección por STm, y la infección por *S. paratyphi* y/o ST.

- 15

En un aspecto relacionado, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la infección y/o enfermedad por *Salmonella* que contiene OmpD, especialmente la infección por NTS y/o enfermedades tales como la infección y/o enfermedad por STm, que comprende la administración de un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en el polipéptido que se define en (i) y (ii) anteriormente.

- 20 La OmpD también es característica de la membrana externa de *Salmonella paratyphi*. Por lo tanto, ahora se extrapola que la OmpD de *S. paratyphi*, especialmente, por ejemplo, la OmpD de *S. paratyphi* A, también se puede utilizar en la vacuna para tratar o prevenir la infección y/o enfermedad por *Salmonella paratyphi*.

Por lo tanto, en un aspecto relacionado también se proporciona ahora un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:

- 25 (a) un polipéptido que es una OmpD de *S. paratyphi* o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad para generar una respuesta de anticuerpo contra *S. paratyphi*, o
- (b) una variante de un polipéptido como se define en (i) que tiene dicha capacidad,

para su uso en la terapia (terapia preventiva o tratamiento). Dicho polipéptido inmunogénico puede estar incluido en una vacuna multi-subunitaria como se ha expuesto anteriormente.

- 30 Desde otra perspectiva adicional relacionada, se proporciona el uso de un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en

- (a) un polipéptido que es una OmpD de *S. paratyphi* o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad para generar una respuesta de anticuerpo contra *S. paratyphi*; o
- (b) una variante de un polipéptido como se define en (i) que tiene dicha capacidad,

- 35 para su uso en la fabricación de una composición vacunal para su uso en el tratamiento o prevención de la infección y/o enfermedad por *Salmonella* que contiene OmpD, especialmente la infección o enfermedad por *S. paratyphi*. Como en el caso de las composiciones vacunales para NTS expuestas anteriormente, se puede emplear uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales, por ejemplo, que se seleccionen de entre las porinas de membrana externa de NTS (por ejemplo, preferentemente una OmpD de NTS tal como la OmpD de STm), y/o ST y/o *S. paratyphi* o
- 40 fragmentos inmunogénicos de las mismas.

En un aspecto relacionado, se proporciona una composición vacunal que proporciona un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en el polipéptido que se define en (a) o (b) anteriores y que incluye un adyuvante. El adyuvante puede ser una molécula excipiente de adyuvante conjugado con el polipéptido que se define en (a) o (b). Este puede ser una proteína de fusión, tal como cualquiera de las que se describen en el presente documento.

- 45 En otro aspecto adicional relacionado, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la infección y/o enfermedad por *Salmonella* que contiene OmpD, especialmente *S. paratyphi*, que comprende la administración de un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en el polipéptido que se ha definido en (a) o (b) anteriormente.

La presente invención también es útil en el tratamiento y particularmente la profilaxis de la bacteriemia. En particular, la bacteriemia se puede suprimir en pacientes vacunados con el presente inmunógeno.

- 50 Los anticuerpos que se producen por el presente inmunógeno son preferentemente tipo IgG o IgM.

La secuencia de aminoácidos de la OmpD es bien conocida. La referencia del presente documento al polipéptido OmpD también puede cubrir la secuencia de polinucleótido que lo codifica.

Descripción detallada

La OmpD para su uso en una vacuna de acuerdo con la invención se puede aislar de las células bacterianas o producirse de manera recombinante. Como se ha indicado anteriormente, las versiones truncadas de OmpD también se pueden emplear siempre que mantengan la inmunogenicidad necesaria. Los análogos de dicho fragmento de OmpD u OmpD completa que mantengan la capacidad para dar lugar a una respuesta de anticuerpo que se desea, especialmente, por ejemplo, contra STm, se pueden construir por técnicas conocidas de modificación proteica. Pueden tener una o más sustituciones y/o eliminaciones y/o adiciones, por ejemplo una o más sustituciones conservadoras que den como resultado una inmunogenicidad deseada que se mantiene observable en estudios de desafío, por ejemplo en ratones desafiados con STm.

Se conciben variantes, fragmentos o análogos de OmpD, siempre que den lugar a una respuesta inmunitaria que se describe en el presente documento.

Las variantes tienen preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 99 %, más preferentemente al menos un 99,5 % y más preferentemente al menos un 99,9 % de homología de secuencia (como sea apropiado) respecto a la secuencia de aminoácidos de la OmpD de tipo silvestre, que está altamente conservada entre los géneros, o con una secuencia de polinucleótido que la codifica o una complementaria de la misma. Dicha determinación se puede hacer utilizando el programa BLAST por ejemplo.

Se puede proporcionar una OmpD o un fragmento o un análogo de la misma en forma de proteína de fusión. Como se ha indicado anteriormente, se puede considerar conveniente o preferible proporcionar, por medio de dicha proteína de fusión, un componente adyuvante. Los polipéptidos adecuados que se van a utilizar para este fin se pueden seleccionar de excipientes polipeptídicos bien conocidos en la técnica de vacunas para este fin, algunos de los cuales se han enumerado anteriormente. Las flagelinas y otros excipientes polipeptídicos también se pueden considerar para este fin. Sin embargo, igualmente se puede proporcionar un adyuvante por separado.

Como también se ha indicado anteriormente, el uso de una OmpD nativa, un fragmento de la misma o una variante de dicho polipéptido que mantenga la capacidad para generar el anticuerpo pueden combinarse deseablemente con el uso de uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales en una vacuna multi-subunitaria. Por lo tanto, se pueden proporcionar uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales que se seleccionan de entre los polipéptidos que comprenden o consisten en (i) una porina de membrana externa de NTS, ST o *S. paratyphi*, por ejemplo, una OmpC de ST o un fragmento inmunogénico de la misma, y (ii) versiones modificadas de dichos polipéptidos que mantengan la capacidad para generar una respuesta de anticuerpo contra Salmonela. Dicho polipéptido puede ser, por ejemplo, una variante de OmpD nativa en comparación con la OmpD de STm o un fragmento inmunogénico de la misma. Como se ha señalado anteriormente, dicho uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales se pueden proporcionar para ampliar la especificidad, incluyendo la provisión de una vacuna de amplio espectro eficaz contra NTS, especialmente STm, y adicionalmente contra salmonellas tifoideas tales como *S. typhi* y/o *S. paratyphi*.

Además de los estudios que se muestran en las Figuras 1-4, los inventores han llevado a cabo experimentos adicionales y han llegado a varios hallazgos adicionales como se exponen posteriormente.

Los inventores han determinado, por ensayos estructurales, que las porinas aisladas utilizadas en estos estudios mantienen sus propiedades nativas, demostrando que los anticuerpos se dirigen a las porinas proteicas funcionales.

Los presentes inmunógenos han demostrado ahora que inducen células plasmáticas específicas de porinas en el bazo de ratones 4 días tras la infección. Esto demuestra que la respuesta es inducida rápidamente por estos inmunógenos, lo que claramente es beneficioso para una vacuna.

Los inventores han descubierto que los linfocitos T son necesarios para la producción eficaz de anticuerpos IgG activados contra porinas. Sin embargo los linfocitos T no son necesarios para la inducción de IgM. Por lo tanto, los anticuerpos generados contra el inmunógeno serán preferentemente IgM o IgG. En el caso de IgG, se prefiere que el vacunado o el paciente tengan un recuento de linfocitos T suficiente para facilitar la inducción de IgG. Si no es así, entonces bastará con otros tipos de inmunoglobulinas, tal como IgM.

La inmunización con porinas ha demostrado que es suficiente para suprimir la bacteriemia, un marcador de la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, la profilaxis de la bacteriemia es particularmente preferida, aunque también se concibe el tratamiento.

De hecho, los inventores han demostrado también que la inmunización de un paciente o un vacunado dos veces confiere un beneficio mayor que una sola inmunización. Se prefiere por lo tanto que el tratamiento comprenda al menos dos o más, y preferentemente 3 o más o, 4 o más, vacunaciones que comprenden el presente inmunógeno. Sin embargo se prefieren particularmente dos vacunaciones. Se pueden separar adecuadamente más de dos o más días.

Los inventores han confirmado que la infección de ratones, con bacterias que carecen de OmpF y OmpC (las otras porinas que se encuentran en la preparación purificada de porinas) pero que aún expresan OmpD, disminuye y la bacteriemia se suprime tras la inmunización con el presente inmunógeno. Por el contrario, en los ratones inmunizados con porinas de bacterias que carecen de OmpD pero que tienen suficiente OmpF y OmpC no disminuye (véase la Figura 3), con una moderada bacteriemia a un nivel más marginal. Además, aún se mantienen los anticuerpos que se unen a las porinas de la pared celular.

Por último, los inventores han demostrado que el modelo murino también responde a las vacunas tales como las de polisacárido Typhim (una vacuna actual contra la fiebre tifoidea). Esto puede ser importante porque los niños menores de 2-3 años no responden a esta vacuna y son los niños de esta edad los que son susceptibles a NTS. Esto apoya la importancia de estos linfocitos B1b. Preferentemente, el polisacárido Typhim también se puede utilizar como adyuvante en la presente invención, en particular en una vacuna para niños de 3 años de edad o menores.

Cuando se hace referencia a un uso particular, se apreciará que esta englobe el procedimiento de tratamiento correspondiente. En otras palabras, la invención también proporciona un procedimiento de tratamiento y procedimientos de vacunación de un individuo o una población, comprendiendo dichos procedimientos por ejemplo la administración del presente inmunógeno, opcionalmente con un adyuvante a un paciente que necesita del mismo o a un individuo o población que se va a vacunar.

Los medios de suministro del inmunógeno adecuados se conocen bien en la técnica, pero pueden incluir el uso de un inmunógeno soluble, la encapsulación en liposomas, o la formación de un ISCOM (Complejo inmunoestimulante). El suministro puede ser también por medio de un polinucleótido que codifique el inmunógeno, por ejemplo suministrado por medio de un plásmido o un vector vírico (tal como retrovírico) que comprende dicho polinucleótido. Por lo tanto, el polipéptido inmunogénico puede, preferentemente, expresarse a partir de un polinucleótido. También se prefiere el uso de adyuvantes basados en aluminio y otros.

La invención se describe además a continuación en la siguiente ejemplificación en referencia a las figuras siguientes:

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Resultados de los estudios que muestran que las porinas inducen una respuesta de anticuerpo específica, rápida en ausencia de linfocitos T. (A) A los 4 días tras la infección por vía i.p. con STm, los ratones deficientes en linfocitos T pueden inducir una respuesta de células plasmáticas esplénicas, extra-folicular, rápida contra STm que da como resultado unos aumentos notables de anticuerpos séricos contra LPS y Omp, pero no contra flagelina. (B) Las Omp altamente purificadas de STm, OmpC, OmpD y algunas OmpF. (C) Las porinas inducen rápidamente anticuerpos IgM independientes de linfocitos T que son específicos de porinas proteicas. Todos los ratones se inmunizaron/infectaron por vía i.p. NI = no inmunizados.

Figura 2. Resultados que muestran que los anticuerpos contra las porinas de STm pueden proteger contra STm como se trata adicionalmente posteriormente. (A) Los ratones que se inmunizaron con STm inactivada por calor o las porinas purificadas (Figura 1B) mostraban una caída aproximadamente equivalente a 100-1000 veces del número bacterias en el bazo en comparación con los ratones no inmunizados, 4-5 días tras la infección con STm. (B) La protección conferida por la inmunización con porinas está mediada por linfocitos B ya que la infección de los ratones inmunizados con porinas que carecían de linfocitos B (ratones IgH ^{-/-}) no confería ninguna ventaja (panel de la izquierda). Además, la opsonización de bacterias con anticuerpos a partir de ratones deficientes en linfocitos T inmunizados con porinas antes de la infección confería significativamente más protección que la opsonización con sueros de ratones no inmunizados (panel de la derecha). (C) En ratones deficientes en CD28 que no pueden activar eficazmente IgG1 o IgG2a pero que siguen teniendo linfocitos B e IgM, aún se inducen anticuerpos contra las porinas y se confiere protección pero esta protección no es tan grande como cuando se inducen anticuerpos activos. (D) La inmunización con porinas puede disminuir la infección por una cepa de STm (SL 1344) altamente virulenta en cepas susceptibles de ratones. (E) Mientras las porinas de STm que contienen OmpD, OmpC y OmpF podían conferir beneficios contra la infección, las porinas de ST preparadas de manera similar y que contienen OmpF y OmpC no podían. Además, este beneficio no era debido a LPS ya que la inmunización con una preparación comercial altamente pura de LPS de STm (Axxora) también fallaba en conferir protección contra la infección.

Figura 3. Resultados que demuestran que la protección con porinas puede estar mediada, en gran parte, por la OmpD. (A) Los ratones se sensibilizaron con porinas durante 35 días antes del desafío con STm o STm deficiente en OmpD y se evaluaron las respuestas 5 días después. El número de bacterias en el bazo y el hígado era similar en el grupo de STm deficiente en OmpD, independientemente de si los ratones se inmunizaban con porinas de antemano. (B) Reactividad de IgM en los sueros de ratones deficientes en linfocitos T o ratones deficientes en linfocitos T inmunizados durante 7 días con porinas. Los sueros se ensayaron contra dos grupos de antígenos: fracciones de pared celular de STm o STm carente de OmpD. La unión de los sueros inmunes a la fracción de porina (encuadrada) a partir de STm deficiente en OmpD está disminuida.

Figura 4. La STm y las porinas purificadas inducen una población de linfocitos B1b independientemente de linfocitos T que puede proteger contra la infección. (A) Linfocitos de la cavidad peritoneal evaluados antes, o 4 días después del antígeno. La fila superior muestra la expresión de B220 y CD5. Debajo está la expresión de CD21 y CD23 para la población de B1b, B220^{int}CD5. (B) Linfocitos B1b en ratones deficientes en linfocitos T no inmunizados e inmunizados con porinas. NI = no inmunizados. (C) Linfocitos B1b transferidos a ratones IgH^{-/-} (deficientes en linfocitos B) e inmunizados con porinas confieren protección contra STm. Los ratones deficientes en linfocitos B y quiméricos se sensibilizaron con porinas durante 21 días antes de la infección durante 5 días. Los quiméricos estaban protegidos contra la infección (panel de la izquierda) y producían IgM anti-porinas. Los animales deficientes en linfocitos B sin linfocitos B1b pero sensibilizados con porinas no estaban protegidos. La caracterización de estas células había mejorado respecto a la reciente publicación de los inventores: Cunningham y col. (PNAS, June 16, 2009, vol. 106, nº 24, pp 9803-9808).

Figura 5. La inmunización con porinas disminuye la bacteriemia tras la infección con STm. los recuentos bacterianos en la sangre de ratones TS NI e inmunizados con porinas, infectados con 5×10^6 STm (panel de la izquierda) o STm que carece de OmpD (panel central) o STm que carece de OmpR (panel de la derecha) durante 5 días. NI = no inmunizados. * -significa $P < 0,05$.

Figura 6. Las inmunizaciones múltiples con porinas confieren mayor protección contra la infección por STm que la inmunización única. Recuentos de bacterias en bazo e hígado de ratones TS que se inmunizaron una vez (panel de la izquierda) o dos veces (panel de la derecha) con porinas e infectados con 3×10^3 STm de la cepa SL 1344 durante 4 días. NI = no inmunizados *- significa $P < 0,05$; ** - significa $P < 0,01$.

Figura 7. La infección con STm deficiente en OmpR, que carece de OmpF y OmpC pero mantiene la expresión de OmpD, es moderada tras la inmunización con porinas. Los ratones TS no inmunizados (NI) o inmunizados con porinas se infectaron con 5×10^6 STm (círculos cerrados) o 5×10^6 STm que carecían de OmpR (STmOmpR⁻ cepa RAK83; círculos abiertos) durante 5 días y se enumeran los números bacterianos en bazo (panel de la izquierda) e hígado (panel de la derecha). Análisis de Inmunotransferencia (derecha) de IgM de ratones TCRBbd^{-/-} NI e inmunizados con porinas contra aislados de paredes celulares de STm o STm que carece de OmpR. La región encuadrada muestra la Mr aproximada de la porina OmpD. Se aplicó el ensayo de Mann-Whitney para comparar la significación estadística entre los grupos unidos por barras. *-significa $P < 0,05$.

Figura 8. La inducción de IgG aumenta los beneficios de la inmunización con porinas. Inducen linfocitos B1b. Los ratones TS o TCRbd^{-/-} NI o inmunizados con porinas se infectaron con 5×10^6 de STm durante 5 días y se enumeran los números bacterianos (panel de la izquierda). El panel de la derecha muestra los títulos de IgM en el suero de los ratones TS y TCRbd^{-/-} NI e inmunizados con porinas infectados el día 5 con STm. NI-no inmunizado. ** -significa $P < 0,01$; NS – no significativo.

La presente invención se describirá ahora en los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Ratones, cepas bacterianas e inmunógenos

Los ratones de tipo silvestre (TS) se obtuvieron de colonias domésticas. Las fuentes de ratones deficientes genéticos se expusieron en otro sitio (Cunningham y col. (2007) J. Immunol. 178, 6200-7 y Gaspal y col. (2008) J. Immunol. 180, 2824-9) con la excepción de los ratones deficientes en $\beta\delta$ TCR, que se obtuvieron en Jax. Todos los ratones y grupos tenían una edad (6-12 semanas) y sexo establecido antes de su uso. El serovar Typhimurium de *Salmonella enterica* SL1344 es una cepa TS y la cepa SL3261 es una cepa atenuada deficiente en AroA. La STm deficiente en OmpD se generó con la SL3261 como base.

Las preparaciones de Omp total se generaron como se había descrito anteriormente por extracción con un 2 % (v/v) de Triton X-100 a partir de envolturas celulares y recolectadas por centrifugación. Se generaron las porinas purificadas utilizando procedimientos bien establecidos (Salazar-Gonzalez y col. (2004) Immunol. Letts 93, 115-22) a partir de ST (cepa 9933) y STm (cepa ATCC 14028).

En resumen, se aislaron las porinas del sobrenadante células sonicadas tratadas con nucleasa y con $MgCl_2$, seguido por el tratamiento repetido con tampones que contenían Tris HCl con SDS y una purificación final con FPLC sobre una columna Sephacryl S-200. Las fracciones que contenían porinas se evaluaron por electroforesis en gel antes de la diálisis extensa contra PBS que contenía un 0,1 % de SDS. Tras la purificación, las porinas se almacenaron a TA o a $-80^\circ C$. El ensayo de lisado de amebocitos *Limulus* mostraba que la contaminación con LPS era de 0,06 EU / 480 μg de porinas. La identidad proteica se confirmó por digestión con tripsina y análisis utilizando un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo Quadrupole en la Unidad Funcional de Genómica y Proteómica en la Universidad de Birmingham.

Se obtuvo LPS de STm de calidad TLR en (Axxora; producto ALX-581-011-L002) y estaba altamente purificado para eliminar cualquier reactividad cruzada con TLR2. Se generó la flagelina como se describió en otro sitio y se purificó

hasta la homogeneidad por inmunoprecipitación. OVA, calidad Imject, se adquirió en Thermo Scientific.

Inmunización e infección de ratones y experimentos de opsonización

Los ratones se inmunizaron por vía i.p. con proteínas o LPS a 20 µg en PBS por animal, a menos de que se estableciera otra cosa. Los ratones se infectaron con cepas atenuadas de bacterias a 10^5 o 10^6 organismos por animal como se ha descrito para cada experimento. Los ratones se infectaron por vía i.p. con 3×10^3 bacterias TS SL1344. En los tiempos especificados tras la infección, los ratones se sacrificaron y se aislaron los tejidos. El número de bacterias por bazo o hígado se identificó por cultivo directo de los tejidos como se ha descrito anteriormente. Los experimentos que implicaban la infección de los ratones tras la opsonización de la bacteria *in vitro* se llevaron a cabo como se había descrito anteriormente. Antes de la opsonización, los complementos de los sueros se inactivaron por calor a 56 °C durante 20 minutos antes de la dilución y mezcla con las bacterias durante 30 minutos a temperatura ambiente. En cada experimento, se utilizó un único suero por ratón y habitualmente se utilizaron múltiples ratones por cada muestra de suero. Para cada experimento se evaluó la viabilidad bacteriana y el fallo en aglutinarse.

Inmunohistología, ELISA, electroforesis en gel y transferencia de Western

La inmunohistología para la detección de células plasmáticas (células CD138+, anticuerpo de BD Pharmingen) y las células IgD+ se había descrito anteriormente (Cunningham y col. (2007) J. Immunol, 178, 6200-7) con la excepción de que el anti-IgD que se utilizaba era un policlonal de oveja (Abcam ab9177 - 1; 1:1000) y el complejo estreptavidina-APC que se utilizó era el kit Vectastain ABC-AP de Vector Laboratories. Los sueros se evaluaron en cuanto a los niveles de anticuerpos por ELISA utilizando procedimientos que se han descrito anteriormente, en los que los antígenos se revistieron con 5 µg/ml para antígenos proteicos y LPS o 10 µg/ml para el organismo completo. Se utilizaron anticuerpos de cabra anti-IgM de ratón unidos a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates) y se desarrolló el color utilizando comprimidos de fosfato de p-nitrofenilo Sigma Fast. Las proteínas se separaron en un gradiente de gel de 4-20 % (Thermo Scientific) o en geles al 12 % o 15 % utilizando procedimientos convencionales. Para la transferencia, tras la electroforesis las proteínas se transfirieron en una membrana PVDF y se bloqueó la membrana. La membrana se bloqueó durante una noche y se lavó antes de eliminar la HRP endógena utilizando el sustrato SG (Vector Laboratories). Tras lavar la membrana se incubó con el suero apropiado durante una noche y luego se sondearon con anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón conjugado con HRP (Southern Biotech) durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó entonces antes de desarrollarse utilizando la Superseñal Quimioluminiscente (Thermo Scientific).

Análisis FACS y clasificación celular

Las células del exudado peritoneal (PEC) se obtuvieron por lavado y se tiñeron con uno o más de estos mAb anti-IgM de ratón FITC, CD3 PerCPcy5, CD5 PEcy5, B220 APC, CD21FITC y CD23PE (todos ellos de E-bioscience; clones eB121-15F9, 145-2C11, 53-73, RA3-6B2, 8D9, B3B4 respectivamente). Las células se analizaron con un citómetro de flujo FAC-Callibur (BD Biosciences) y los datos se analizaron utilizando WinMDI2.9. Para la transferencia, las células se aislaron de los ratones inmunizados 4 días previamente con porinas y linfocitos B1b (B220^{int} CD5) y se clasificaron utilizando un clasificador celular MoFlo. Las células (2×10^5) se transfirieron a ratones IgH-/- y tres días más tarde se inmunizaron por vía i.p. con 20 µg de porinas. El éxito de la transferencia se confirmó por los anticuerpos anti-IgM y anti-porina del suero a los 5 días después y antes del desafío con STm.

Estadísticas

Las estadísticas se calcularon utilizando el ensayo de intervalos de suma no paramétrica de Mann-Whitney. Los valores de p se calcularon utilizando el programa Analyze-it.

Resultados

1. La preparación de STm y proteínas totales de membrana externa de STm induce una respuesta rápida de células plasmáticas independientes de T

Como se ha indicado anteriormente, se había establecido anteriormente que las STm podían inducir una rápida y extensa respuesta de linfocitos B y que una diana principal de la respuesta activada temprana eran las proteínas de la membrana externa pero no los LPS o FliC. Para diseccionar esta respuesta con más detalle, se utilizaron ratones que carecían completamente de linfocitos T (ratones deficientes β T-CR). La infección con Salmonela atenuada daba como resultado un gran aumento de células plasmáticas CD138⁺ sobre el día 4 de la infección y esto era paralelo a la rápida inducción de suero IgM contra Salmonela (Fig. 1A). El análisis más detallado de la respuesta de anticuerpos demostraba que había una inducción más fuerte de anticuerpo contra LPS y una preparación de proteínas de membrana externa total pero una inducción de anticuerpos mucho menos marcada contra FliC (Fig. 1A).

2. Inmunización de ratones deficientes en linfocitos T con una preparación de porina de STm altamente purificada

Para extender los estudios señalados anteriormente, se investigó la respuesta a una preparación de porina de membrana externa altamente purificada que contenía OmpC, OmpD, y OmpF en ratones deficientes en linfocitos T (Fig. 1B). El ELISA y transferencia de Western de los sueros de ratones inmunizados confirmaban la inducción de IgM específica del antígeno (Fig. 1C). Por lo tanto los anticuerpos contra las porinas de STm se inducen en ausencia de ayuda de linfocitos T.

3. La protección contra la infección por STm inducida por porinas está mediada completamente por linfocitos B

Se evaluó entonces si el anticuerpo inducido tras la inmunización con una única dosis de porinas purificadas podía disminuir la infección por STm. Se inmunizaron ratones TS con porinas y se desafiaron con *Salmonella* atenuada 35 días más tarde. Como comparación inicial, se comparó el nivel de protección que ofrecen las porinas con el que ofrecían las bacterias inactivadas por calor. La inmunización tanto con porinas purificadas como con bacterias inactivadas reducía la carga bacteriana esplénica una media de 2-3 logs (Fig. 2A). Además, el anticuerpo inducido por porinas al 4º día de inmunización podía reducir la infección aproximadamente un 50 % (datos no mostrados). Para evaluar si los linfocitos B mediaban en esta protección, se inmunizaron ratones TS y ratones que carecían de todas las células B (ratones deficientes en IgH) con porinas y se infectaron tras 35 días. Esto demostraba una anulación completa de la protección conferida por las Omp en ausencia de linfocitos B (Fig. 2B). Por el contrario, la opsonización de bacterias con suero de ratones deficientes en linfocitos T inmunizados con porina era suficiente para disminuir la infección.

Como se ha demostrado que los linfocitos B son necesarios para la protección y la IgM sola podría conferir un beneficio, se determinó si había un beneficio aditivo con anticuerpos activados, sobre y por encima de IgM, inmunizando animales deficientes en CD28 con Omp e infectados 35 días más tarde. Mientras que la inducción de IgM con porinas está favorecida en ratones deficientes en CD28 (Fig. 2C) estos ratones eran incapaces de inducir una activación. Estos estudios demostraban que las cargas bacterianas eran aproximadamente 10 veces mayores en animales deficientes en CD28 indicando que un 90 % de la protección que se observaba estaba mediada por la IgG (Fig. 2C). Estos resultados eran similares a los que se encontraban en experimentos equivalentes utilizando ratones deficientes en CD40L, que también tenían una activación defectuosa.

Después se evaluó si el anticuerpo anti-porina podía reducir la carga bacteriana en ratones infectados con STm TS SL1344. Esto demostraba que las cargas bacterianas en el bazo e hígado 4 días tras la infección tenían números medios de bacterias de 20 y 40 veces menores respectivamente en comparación con los ratones que no se habían inmunizado (Fig. 2D).

Por último, se examinó si cualquier contaminación residual con LPS podía tenerse en cuenta para estos hallazgos y si las porinas de ST podían proporcionar beneficios similares. Los ratones se inmunizaron con LPS de STm de calidad TLR disponibles en el mercado o con porinas de ST y luego se infectaban 35 días más tarde. Sorprendentemente, los LPS de calidad TLR no conferían protección contra la infección con bacterias atenuadas (Fig. 2E). De manera similar, como se ha señalado anteriormente, las porinas de ST no conferían una protección selectiva. La falta de protección que ofrecían las porinas de ST era sorprendente considerando la homología casi completamente idéntica entre la OmpF y OmpC de ST y STm.

4. La protección conferida por las porinas de STm está mediada por anticuerpos contra OmpD

Para ensayar si la OmpD contribuía a la protección que ofrecía la inmunización por porina de STm, los ratones se inmunizaron con porinas de STm y después de 35 días se infectaron con STm o STm que carecía de OmpD. Esto demostraba que la inmunización no confería beneficios a los ratones infectados con STm deficientes en OmpD (Fig. 3). Entonces se evaluó cómo los anticuerpos inducidos por las porinas de STm en ratones deficientes en linfocitos T se unían a una preparación de membrana externa de bacterias deficientes en OmpD. Los anticuerpos no se unían a la fracción de porina de las preparaciones proteicas de membrana externa de bacterias que carecían de OmpD. Esto indica que el anticuerpo contra OmpD es una diana importante para el anticuerpo contra STm y puede proporcionar protección contra una infección posterior por STm.

5. Las porinas y STm, pero no los LPS ni la flagelina, inducen una población de linfocitos B CD19+B220^{int}CDS peritoneales

Para evaluar si las poblaciones de linfocitos B innatos se inducían tras la inmunización con STm y porinas de STm, se inmunizaron ratones TS y se evaluaron las respuestas peritoneales el día 4 tras la inmunización. Las porinas inducían una población de linfocitos B que se caracterizaba por tener el fenotipo B220^{int}CD5⁺, característico de los linfocitos B1b que son CD19⁺ e IgM⁺ pero tenían una baja expresión de CD21 y CD23 (Fig. 4A y datos no mostrados). Aunque esta población también era inducida por las STm vivas, no era inducida por los LPS de calidad TLR altamente purificados ni por FlC ni OVA en 0,1 % de SDS (Fig. 4A). Para confirmar la independencia de T de esta población de linfocitos B, se inmunizaron ratones deficientes en β TCR y deficientes en CD28 con proteínas aisladas o *Salmonella* (Fig. 4B; datos no mostrados para ratones deficientes en β TCR pero resultados similares para ratones deficientes en CD28). Se descubrió que la población B1b era inducida tras la inmunización con STm y porinas en ausencia de linfocitos T. Por lo tanto, las STm y las porinas de STm, pero no los LPS inducen una población peritoneal

de linfocitos B que tienen un fenotipo celular B1b. También se ha demostrado que las STm que carecen de OmpR (el regulador de la expresión de OmpF y OmpC y que carecen de la expresión de ambas proteínas) también inducen dichos linfocitos B (datos no mostrados).

6. Los anticuerpos de linfocitos B1b B220⁺CD5⁻ son suficientes para proporcionar una protección suficiente

- 5 Para determinar si el anticuerpo producido por los linfocitos B1b en respuesta a las porinas de STm es suficiente para proporcionar protección, se generaron ratones quiméricos. Se aislaron células B220⁺CD5⁻ a partir de ratones TS intactos inmunizados 4 días antes con porinas y se clasificaron 2×10^5 células B220⁺CD5⁻ y se transfirieron a ratones deficientes en linfocitos B. Cuarenta y ocho horas más tarde, los receptores de linfocitos B1b y los ratones deficientes de linfocitos B se inmunizaron con porinas de STm. Tras 21 días, el éxito de la transferencia se confirmó
- 10 midiendo la IgM anti-porina de los ratones quiméricos inmunizados y de control. Al día siguiente, los ratones inmunizados e intactos se infectaron con 10^6 Salmonelas atenuadas por vía i.p. y se evaluaron la carga bacteriana y los anticuerpos del suero 5 días más tarde. Esto demostraba que solo los ratones que tenían anticuerpos anti-porina y linfocitos B en el momento de la infección eran capaces de disminuir la infección bacteriana (Fig. 4C). Los ratones que se inmunizaron con porinas en ausencia de linfocitos B tenían números bacterianos equivalentes a los ratones
- 15 no inmunizados. Por lo tanto, el anticuerpo de los linfocitos B1b transferidos era capaz de limitar la protección.

Sumario

Para resumir los puntos clave de estos estudios, se ha demostrado:

- 20 1. La respuesta independiente de T contra STm es selectiva con respuestas tempranas pronunciadas contra LPS y Omp pero no contra la molécula FliC de flagelina (Fig. 1A). Una preparación de Omp altamente purificada que contenía las porinas OmpD, OmpC, y OmpF induce una rápida respuesta de anticuerpos específicos de la porina proteica en ratones deficientes en linfocitos T (Fig. 1B y 1C);
- 25 2. La inmunización con porinas o bacterias inactivadas conferían una protección similar contra STm y la protección por porinas era totalmente dependiente de linfocitos B. La IgG aumentaba la eficacia de IgM aproximadamente 10 veces. Por último, la protección no se inducía contra LPS puro o flagelina o porinas de *S. typhi*, que carece de OmpD (véase la Figura 2 y los datos no se muestran);
3. La infección de ratones inmunizados con porina de STm deficiente en OmpD anulaba la protección (Fig. 3A) y el anticuerpo de los ratones inmunizados con porina tenía una unión alterada con una preparación de membrana externa de STm deficientes en OmpD (Fig. 3B);
- 30 4. Las porinas y STm, pero no los LPS, FliC u OVA, inducen linfocitos B1b B220^{int}CD5⁻ en ratones TS y deficientes en linfocitos T (Fig. 4A y B). La transferencia de linfocitos B1b a ratones deficientes en linfocitos B con inmunización por porinas podía proteger contra la infección por STm y esto depende de anticuerpos (Fig. 4C); y

Los linfocitos B1b se auto-renuevan y de manera interesante se ha identificado que son importantes en otras infecciones tales como las causadas por *Borrelia hermensii* y *Streptococcus pneumoniae*. Además se ha expuesto que los linfocitos B1b también pueden responder a proteínas bacterianas de *Borrelia* – la proteína de unión al complemento factor H.

35

Que la proteína OmpD es la diana principal del anticuerpo inducido por las porinas de STm y que los LPS no tienen significación en esta respuesta se demostró por:

- 40 i) la utilización porinas purificadas que tengan niveles de contaminación de LPS indetectables ($< 0,01$ EU/100 μ g de porinas);
- ii) la inmunización con LPS de STm altamente purificados, como los controles muestran que esto no protege;
- iii) la demostración de la pérdida de beneficios de la inmunización con porina tras la infección con bacterias deficientes a OmpD pero suficiente LPS;
- 45 iv) la pérdida de unión del anticuerpo de ratones inmunizados con porina a las paredes celulares bacterianas deficientes en OmpD;
- v) todas las reducciones de títulos bacterianos se anulaban si los linfocitos B no estaban presentes durante la inmunización;
- vi) las porinas inducían una población de linfocitos B1b no inducida por LPS que era suficiente para conferir protección frente a la infección.

En conjunto estos implican fuertemente que el anticuerpo contra las porinas y en particular la OmpD puede reducir el nivel de la infección por NTS.

50

Conclusión

Por lo tanto se indica que la respuesta de anticuerpo contra OmpD puede reducir la infección por STm y que esta respuesta está mediada por linfocitos B y al menos en parte por medio de la inducción de una población de linfocitos B1b independiente de T que es suficiente para disminuir por sí misma la infección por STm.

Ejemplo 2

El siguiente trabajo adicional se llevó a cabo siguiendo los protocolos del Ejemplo 1 cuando era apropiado:

1. En la NTS, la bacteriemia frecuentemente refleja la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, los inventores estudiaron los efectos de la inmunización con porinas sobre la bacteriemia inducida por la infección posterior con STm y STm que carecía de OmpR (que da lugar a la expresión deficiente de OmpF y OmpC) o STm deficiente en OmpD. Los inventores demostraron que la inmunización con porina puede anular la bacteriemia en la infección por STm (Figura 5, panel de la izquierda) y se vio tras la infección de ratones sensibilizados con porina con STm deficiente en OmpR (Figura 5, panel central) pero mucho menos tras la infección con STm deficiente en OmpD (Figura 5, panel de la derecha). Esto indica que el anticuerpo contra las porinas, en particular OmpD, puede reducir la bacteriemia notablemente.
2. Una única inmunización con porinas es suficiente para disminuir la carga bacteriana de STm. Para evaluar si la inmunización de dos veces aumentaba el beneficio de la inmunización con porina se inmunizaron ratones dos veces con porinas y se infectaron con la cepa SL1344 de STm. Esto demostró que la inmunización de dos veces confería un beneficio mayor que la inmunización única (Figura 6).
3. La infección de ratones, inmunizados con porina, con bacterias que carecían de OmpD revela que la inmunización con porina (careciendo de OmpD) no confiere beneficios en términos de reducción del número bacteriano en los tejidos. Por el contrario, la infección de los ratones que carecían de OmpF y OmpC, pero que sí expresaban OmpD, disminuye tras la inmunización con porinas. Esto demuestra que los anticuerpos anti-OmpF u OmpC no son tan potentes para controlar la infección como el anticuerpo anti-OmpD. Además, el anticuerpo de los ratones inmunizados con porina se podía unir a las porinas de la pared celular de bacterias que carecían de OmpF y OmpC, pero no OmpD (Figura 7).
4. Como los efectos de reducción de la infección tras la inmunización con porinas está mediada por linfocitos B y es independiente de T los inventores evaluaron si los Ac activados conferían un beneficio adicional sobre y por encima de la IgM. Para ensayar esto se inmunizaron ratones de tipo silvestre (TS) y deficientes en linfocitos T con porinas y se infectaron 35 días más tarde. Mientras que la IgM específica de porina se inducía en todos los grupos tras la infección (Figura 8), la IgG específica de porina era como mucho indetectable en ratones deficientes en linfocitos T. Las cargas bacterianas eran aproximadamente 40 veces mayores en los ratones deficientes en linfocitos T. En conjunto con el hallazgo de que la inmunización con porina solo era eficaz en presencia de células B y todos los grupos de animales intactos tenían un número de bacterias similar 5 días tras la infección, estos datos sugieren que $\geq 90\%$ del beneficio está mediado por IgG (Fig. 2C).

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:
 - (i) un polipéptido que es una OmpD de *Salmonella* no tifoidea, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad de generar una respuesta de anticuerpos contra la *Salmonella* no tifoidea (NTS); o
 - (ii) una variante de un polipéptido como se ha definido en (i) que tiene dicha capacidad, para su uso en terapia.
2. Un polipéptido inmunogénico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido inmunogénico es para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de la infección y/o enfermedad por NTS.
3. Un polipéptido inmunogénico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el polipéptido inmunogénico es para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de la infección y/o enfermedad por *Salmonella typhimurium* (STm).
4. Un polipéptido inmunogénico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido inmunogénico comprende o consiste en OmpD que se puede obtener de STm, o un fragmento inmunogénico del mismo.
5. Un polipéptido inmunogénico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido inmunogénico es una proteína de fusión en la cual la secuencia de polipéptido definido en (i) o (ii) se une a una segunda secuencia de polipéptido.
6. Un polipéptido inmunogénico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicha segunda secuencia de polipéptido es un excipiente adyuvante proteico.
7. Una composición vacunal que comprende un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:
 - (i) un polipéptido que es una OmpD de *Salmonella* no tifoidea, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad de generar una respuesta de anticuerpos contra la *Salmonella* no tifoidea (NTS); o
 - (ii) una variante de un polipéptido como se ha definido en (i) que tiene dicha capacidad,en la que la composición vacunal comprende adicionalmente uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales.
8. Una composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 7 en la que dicho uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales se seleccionan de entre polipéptidos que comprenden o consisten en:
 - (i) una porina de membrana externa de NTS, *S. typhi* (ST) o *S. paratyphi* o un fragmento inmunogénico de la misma; y
 - (ii) análogos de la misma que mantengan la capacidad para generar una respuesta de anticuerpos contra *Salmonella*.
9. Una composición vacunal que comprende un polipéptido inmunogénico que comprende o consiste en:
 - (i) un polipéptido que es una OmpD de *Salmonella* no tifoidea, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la capacidad para generar una respuesta de anticuerpos contra la *Salmonella* no tifoidea (NTS); o
 - (ii) una variante de un polipéptido como se ha definido en (i) que tiene dicha capacidad,en la que la composición vacunal incluye además un adyuvante.
10. Una composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 9 en la que dicho adyuvante es un polipéptido inmunogénico en forma de proteína de fusión en la cual la secuencia polipeptídica definida en (i) o (ii) se une a una segunda secuencia polipeptídica, opcionalmente en la que dicha segunda secuencia polipeptídica es un excipiente adyuvante proteico.
11. Una composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 que incluye uno o más polipéptidos inmunogénicos adicionales.
12. Una composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 11 en la que dicho uno o más polipéptidos adicionales se seleccionan de entre polipéptidos que comprenden o consisten en:
 - (i) una porina de membrana externa de NTS, ST o *S. paratyphi* o un fragmento inmunogénico de la misma; y
 - (ii) análogos de la misma que mantienen la capacidad de generar una respuesta de anticuerpos contra *Salmonella*.
13. Una composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de una infección por NTS, especialmente una infección por STm.

14. Una composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de la infección por NTS, especialmente la infección por STm, y la infección por *S. paratyphi* y/o ST.

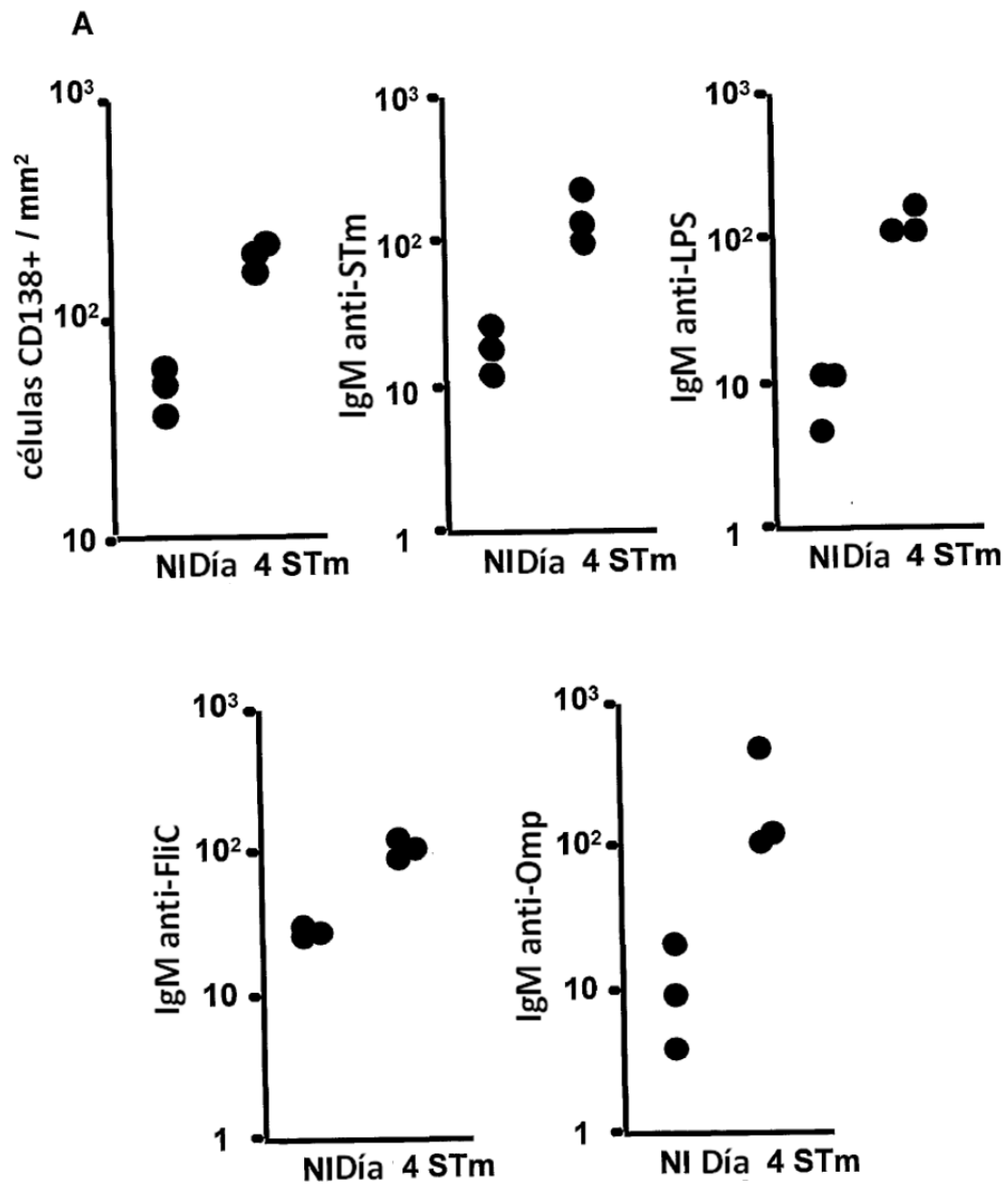
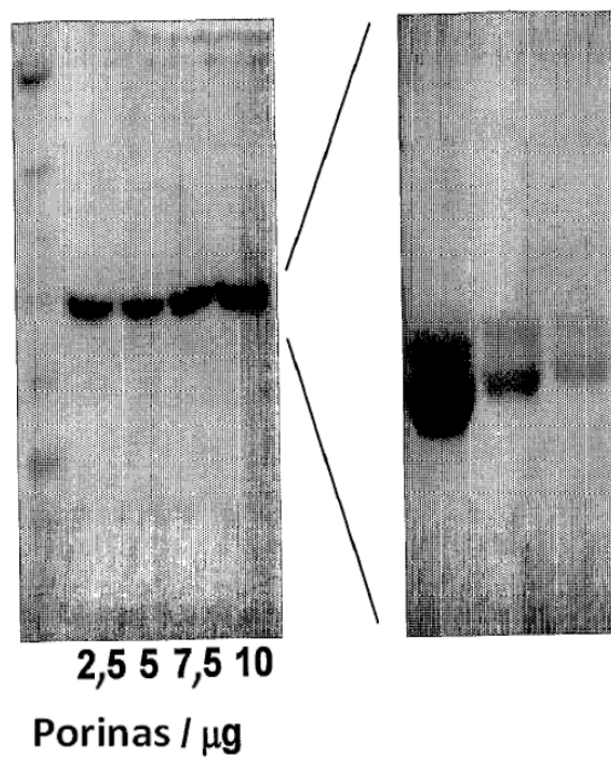


Figura 1

B



C

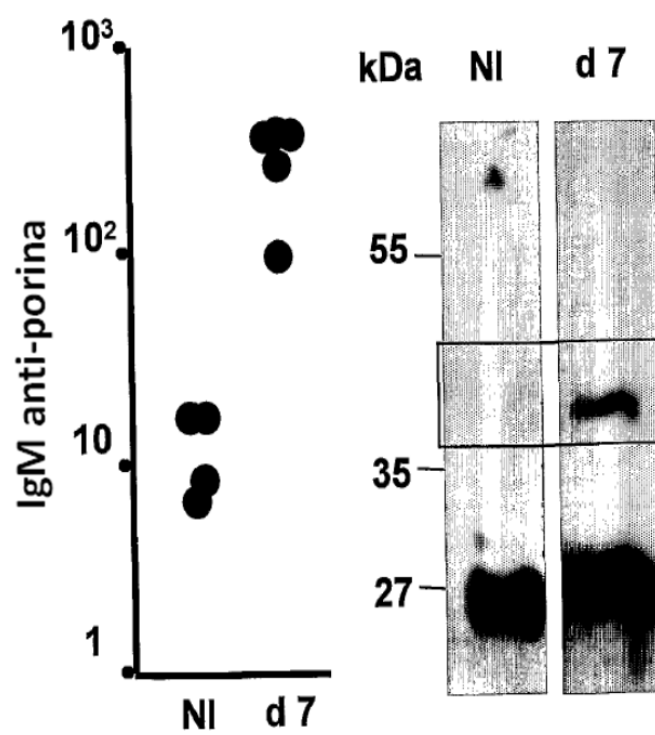


Figura 1 (cont)

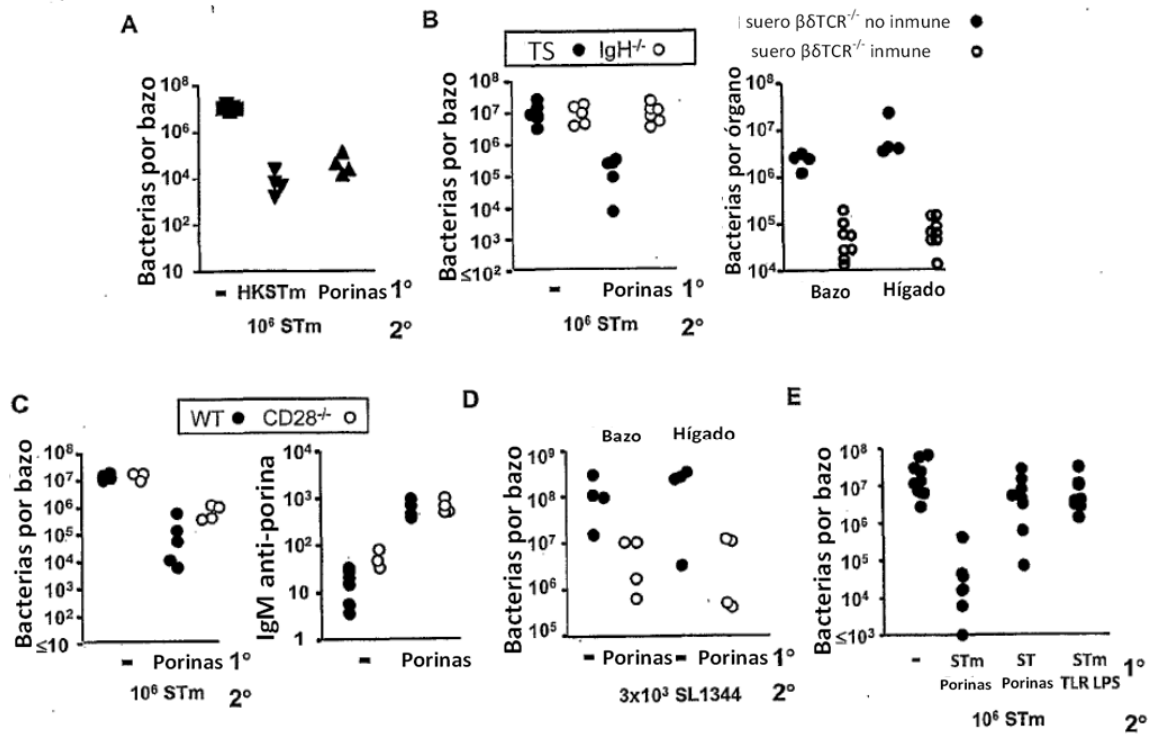


Figura 2

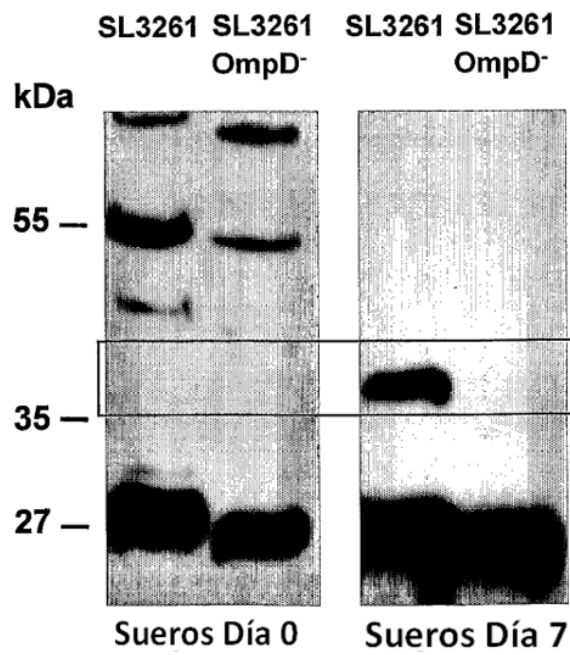
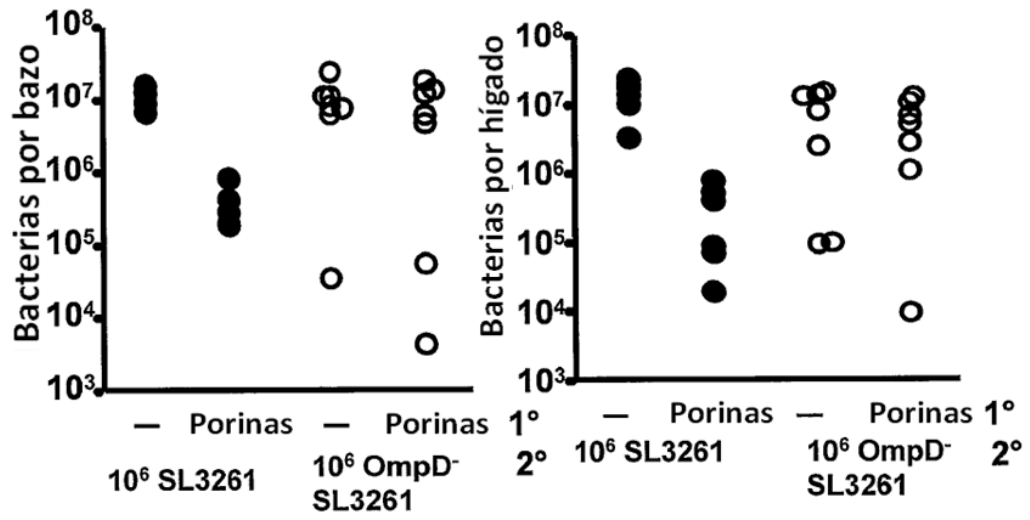


Figura 3

A

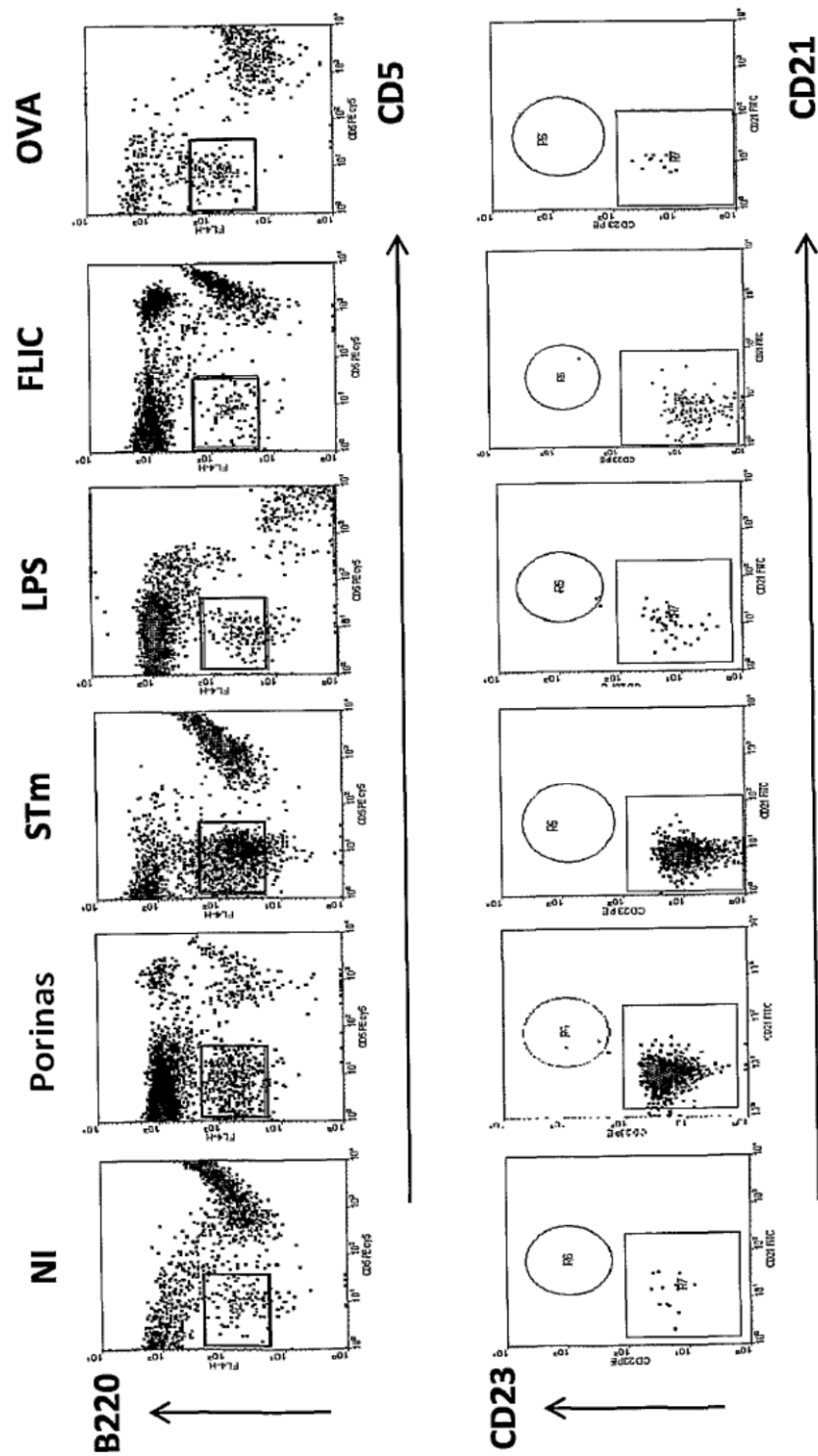


Figura 4

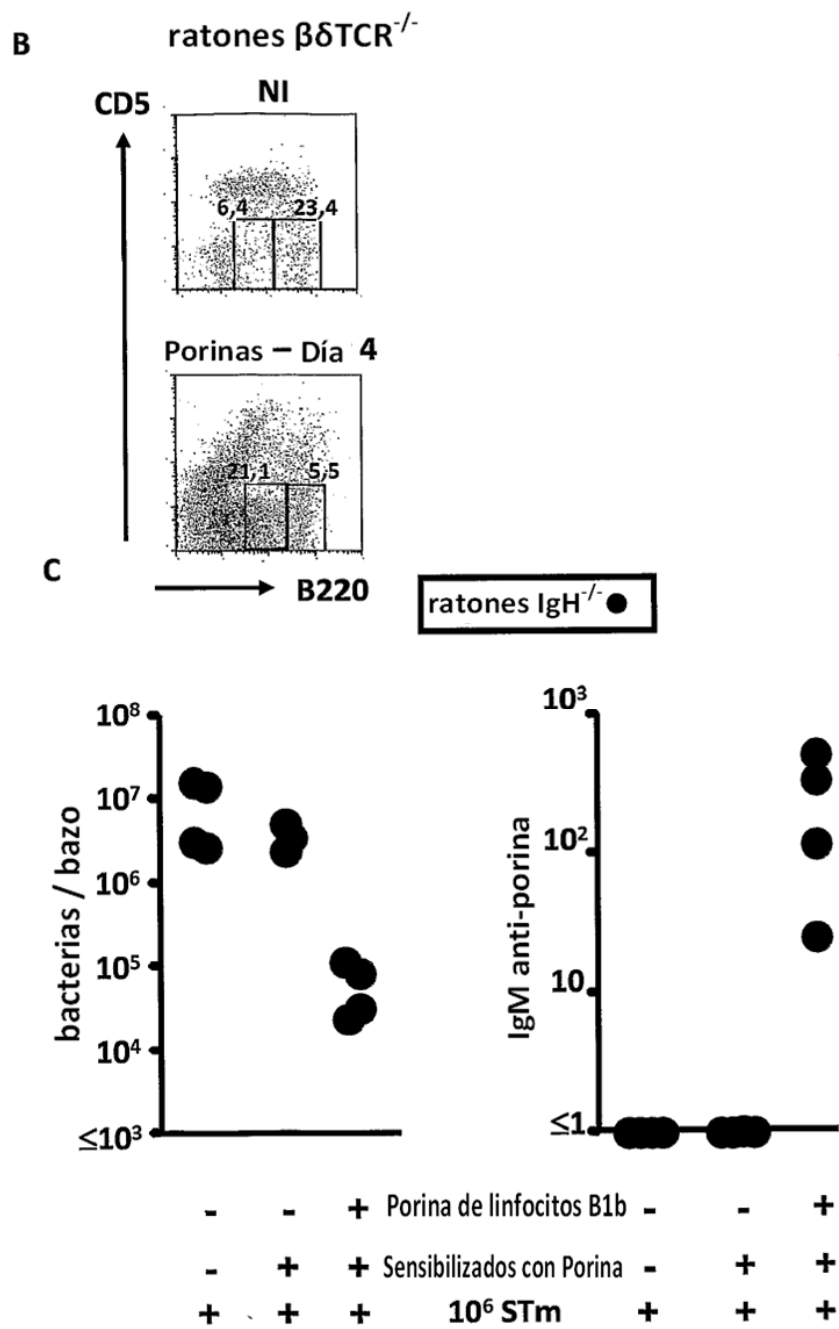


Figura 4 (cont)

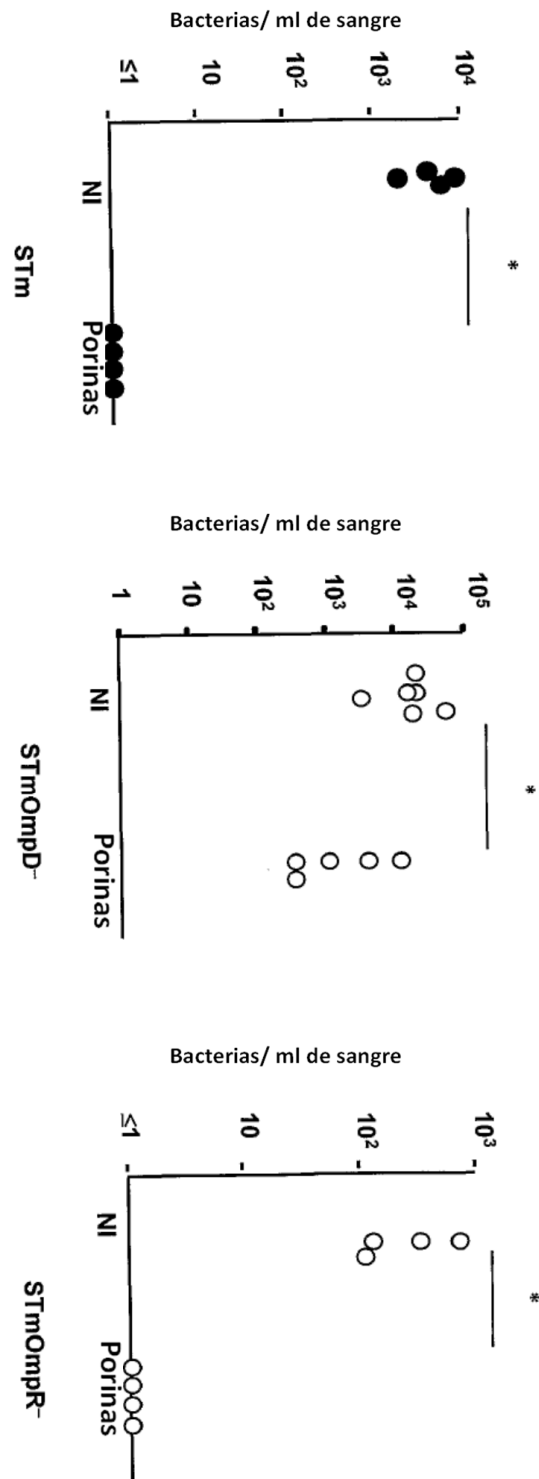


Figura 5

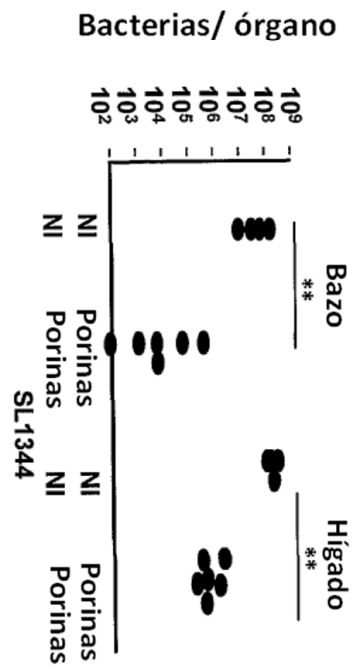
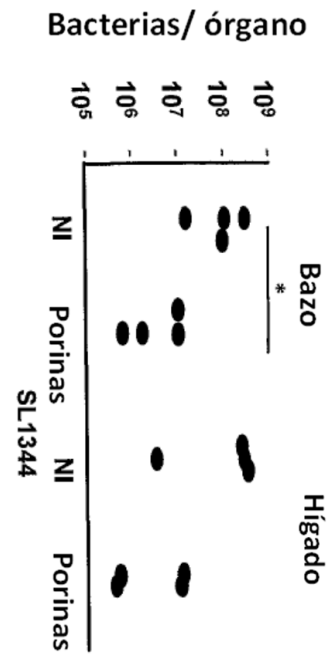


Figura 6

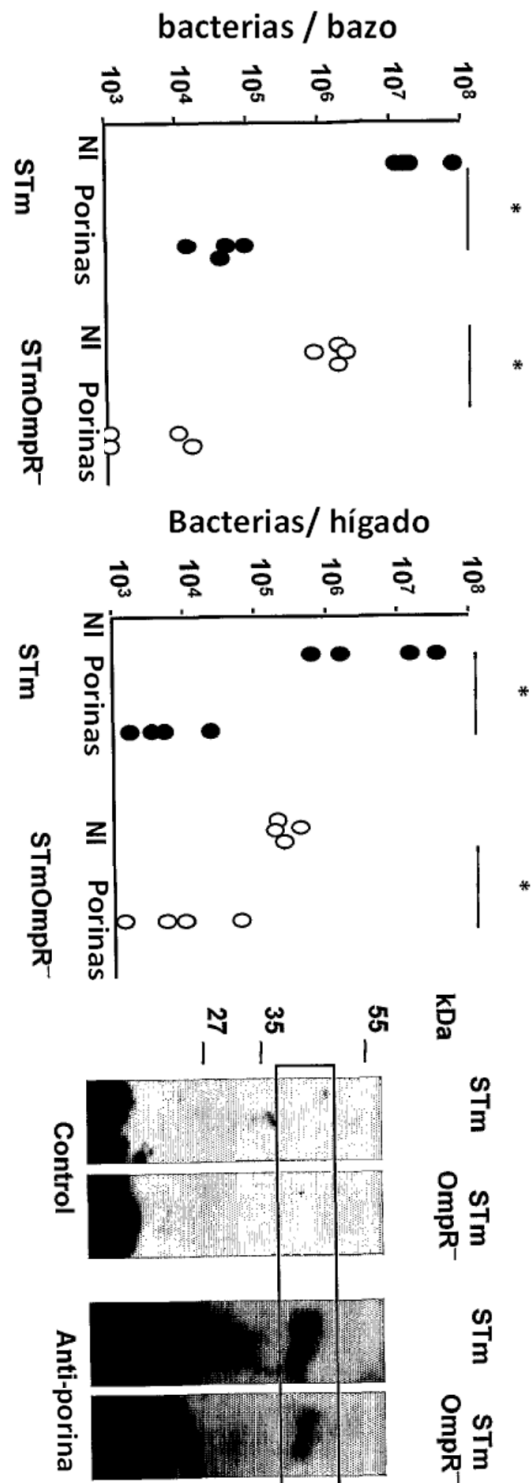


Figura 7

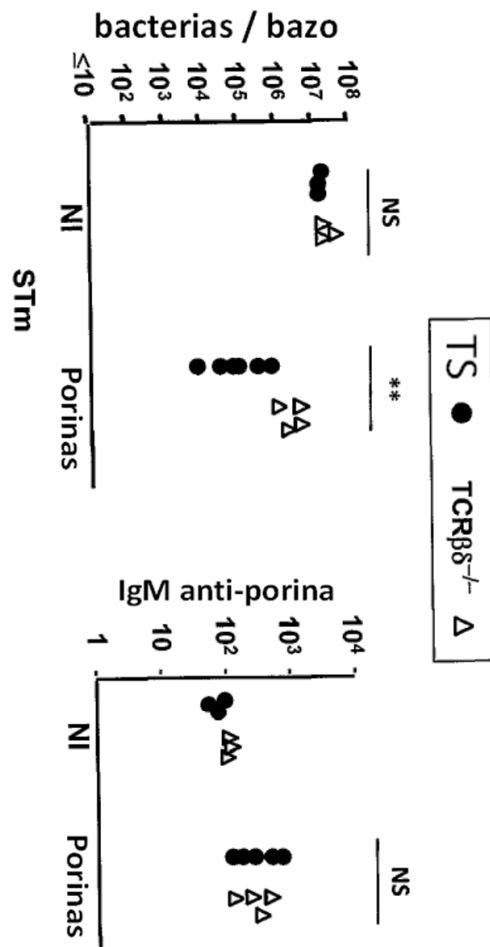


Figura 8