

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 851**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2007 PCT/US2007/017528**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2008 WO08021076**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2007 E 07836580 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2056871**

54 Título: **Vacunas de matriz de proteína y métodos de preparación y administración de tales vacunas**

30 Prioridad:

07.08.2006 US 835944 P
08.06.2007 US 933764 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2018

73 Titular/es:

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (100.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US

72 Inventor/es:

MEKALANOS, JOHN, J.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 658 851 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 matriz de proteína y métodos de preparación y administración de tales vacunas

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere a composiciones de vacuna, métodos de preparación de vacunas, y métodos de administración de vacunas.

Muchos antígenos, particularmente aquellos asociados a una capa de la cápsula del patógeno, estimulan poca o ninguna respuesta inmunitaria y complican los esfuerzos para crear vacunas eficaces contra aquellos antígenos. Las cápsulas son componentes superficiales de los microbios que normalmente están compuestas de polímeros de compuestos orgánicos tales como hidratos de carbono, aminoácidos o alcoholes. Las cápsulas son bastante
10 diversas químicamente. Las unidades monoméricas que constituyen las cápsulas (por ejemplo, hidratos de carbono) pueden unirse en diversas configuraciones moleculares y pueden sustituirse adicionalmente con fosfato, nitrógeno, sulfato, y otras modificaciones químicas. Estas variaciones químicas permiten que las cápsulas presenten numerosas dianas antigénicas sobre la superficie microbiana, permitiendo así el escape del sistema inmunitario del hospedador dirigido a estas dianas. Las cápsulas también pueden ser factores de virulencia que previenen que los
15 microbios sean fagocitados y destruidos por macrófagos del hospedador y leucocitos polimorfonucleares. Anticuerpos contra las cápsulas proporcionan una potente defensa contra organismos encapsulados fijando el complemento a la superficie microbiana, que puede producir su lisis o su opsonización, captación, y destrucción por células inmunitarias fagocíticas del hospedador. Los anticuerpos más potentes contra las cápsulas son anticuerpos IgG. Las cápsulas que dejan de inducir niveles significativos de IgG se llaman antígenos independientes de T. El
20 acoplamiento covalente de una proteína a la cápsula las hace "dependientes de T" y tales antígenos pueden provocar una respuesta de IgG.

Akagi et al. (Journal of Controlled Release 108 (2005) 226-236) describen la preparación y caracterización de nanopartículas biodegradables basadas en poli(ácido gamma-glutámico) con L-fenilalanina como transportador de proteína.

25 Bergquist et al. (APMIS 106:800-806, 1998) describen respuestas de anticuerpos en suero y pulmón a inmunización intranasal con polisacárido de *Hemophilus influenza* tipo b conjugado con la subunidad B de la toxina del cólera y toxoide tetánico.

30 Existe una necesidad de vacunas seguras, sintéticamente accesibles, rentables, dirigidas a la cápsula y otros antígenos independientes de T que no provoquen fuertes respuestas inmunitarias o anticuerpo IgG. Tales vacunas se necesitan para proteger contra diversas enfermedades infecciosas tales como infección por carbunco, neumococos, gripe de tipo B, meningococos y estreptococos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se define por las reivindicaciones.

35 La presente invención se refiere a composiciones de vacuna que contienen un antígeno de interés atrapado con una proteína transportadora en un complejo, métodos de preparación de tales vacunas, y métodos de administración de vacunas.

40 Por consiguiente, en el primer aspecto, la divulgación caracteriza una composición de vacuna que contiene un antígeno de interés y una proteína transportadora, donde (i) no más del 50% del antígeno de interés está reticulado con la proteína transportadora y (ii) donde el antígeno es atrapado con la proteína transportadora para formar un complejo.

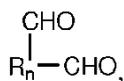
En realizaciones deseables del primer aspecto de la divulgación, el complejo tiene un diámetro de entre 10 nm y 100 μ m. En realizaciones más deseables del primer aspecto de la divulgación, el complejo tiene un diámetro de aproximadamente 100 nm a 100 μ m. En aún realizaciones más deseables del primer aspecto de la divulgación, el complejo tiene un diámetro de aproximadamente 100 nm a 10 μ m.

45 En otras realizaciones deseables del primer aspecto de la divulgación, el complejo, cuando se administra a un mamífero, provoca una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T en el mamífero.

50 En realizaciones deseables adicionales del primer aspecto de la invención, la relación molar del antígeno con respecto a la proteína transportadora está entre 1 a 10 y 10 a 1. Deseablemente, la proteína transportadora es un multímero, por ejemplo, un multímero que incluye al menos 5 subunidades. En otras realizaciones deseables, el multímero es a homomultímero.

En realizaciones deseables adicionales del primer aspecto de la invención, la proteína transportadora está covalentemente unida a al menos otra proteína transportadora. Deseablemente, el enlace covalente contiene un enlace peptídico entre un grupo amino primario de una cadena lateral de lisina y un grupo carboxi de una cadena

lateral de aspartato o glutamato. En otras realizaciones deseables, el enlace covalente incluye un compuesto de fórmula



5 donde R_n es un alquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, - (CH₂CH₂O)_qCH₂CH₂- en la que q es 1 a 4. En realizaciones deseables adicionales, el enlace covalente contiene glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida, o bencidina bis-biazotizada. En aún
10 otras realizaciones deseables, el enlace covalente contiene un reticulante bifuncional. Deseablemente, el reticulante bifuncional es glutaraldehído, bis[sulfosuccinimidil]suberato, o adipimidato de dimetilo.

En otras realizaciones deseables del primer aspecto de la invención, las proteínas transportadoras están unidas no covalentemente. En realizaciones deseables, el enlace no covalente implica una interacción hidrófoba, interacción iónica, interacción de van der Waals, o enlace de hidrógeno.

15 En realizaciones deseables adicionales del primer aspecto de la invención, la proteína transportadora es toxina diftérica o un mutante de la misma, toxoide diftérico, toxina tetánica o un mutante de la misma, toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante de la misma, subunidad B de la toxina del cólera, fragmento C de la toxina tetánica, flagelina bacteriana (por ejemplo, proteína flagelina de *Vibrio cholerae*), neumolisina, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli*, toxina de tipo Shiga (por ejemplo, proteína SttB2 de *Shigella*), proteína
20 LTB humana, neumolisina, listeriolisina O (o proteínas relacionadas), un extracto de proteína de células bacterianas completas (por ejemplo, células de *Pseudomonas aeruginosa* o estreptocócicas), el mutante negativo dominante (DNI) del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*. En realizaciones particularmente deseables, la proteína transportadora es neumolisina, listeriolisina O, toxina diftérica, toxoide diftérico, toxina tetánica, o toxoide tetánico.

25 Según las reivindicaciones, el antígeno de interés es un polisacárido, un polialcohol, o un homopolímero de poliaminoácido. Deseablemente, el polisacárido contiene al menos 18 restos. En otras realizaciones deseables, el polisacárido es un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*, polisacárido de *Francisella tularensis*, polisacárido de *Bacillus anthracis*, polisacárido de *Haemophilus influenzae*, polisacárido de *Salmonella typhi*, polisacárido de especies de *Salmonella*, polisacárido de *Shigella*, o polisacárido de *Neisseria meningitidis*. En realizaciones
30 particularmente deseables, el polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* es uno cualquiera de tipo capsular 1-48, por ejemplo, 3, 4, 6B, 7A, 7B, 7C, 7F, 9A, 9L, 9N, 9V, 12A, 12B, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 17, 18B, 18C, 19F, 23F, 25A, 25F, 33F, 35, 37, 38, 44 o 46. En otras realizaciones particularmente deseables, el polisacárido de *Francisella tularensis* es el antígeno O.

35 En realizaciones deseables adicionales del primer aspecto de la invención, el antígeno de interés como se reivindica es un polímero capsular microbiano. Deseablemente, el polímero capsular microbiano es ácido poli-gamma-D-glutámico de *Bacillus anthracis*.

40 En otras realizaciones deseables del primer aspecto de la divulgación, el antígeno de interés es un polímero orgánico que consiste en monómeros que tienen al menos tres átomos, donde cada uno de los átomos está seleccionado independientemente de carbono, oxígeno, hidrógeno, fosfato, nitrógeno y sulfato. Deseablemente, el polímero orgánico deriva de un microbio. En otras realizaciones deseables, el polímero orgánico no se produce en la naturaleza.

En realizaciones deseables adicionales, la composición de vacuna obtenida por el método reivindicado incluye además un segundo antígeno de interés. Deseablemente, la composición de vacuna incluye además un tercer antígeno de interés.

45 En el segundo aspecto, la invención caracteriza un método de preparación de una composición de vacuna. Este método implica (i) mezclar un antígeno de interés con una proteína transportadora para formar una mezcla del antígeno y la proteína transportadora y (ii) atrapar el antígeno de interés con la proteína transportadora, donde no más del 50 % del antígeno de interés está reticulado con la proteína transportadora en la composición de vacuna.

50 En realizaciones deseables del segundo aspecto de la invención, la composición de vacuna incluye además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otras realizaciones deseables del segundo aspecto de la invención, el atrapamiento implica precipitar el antígeno y la proteína transportadora de la mezcla. Deseablemente, la precipitación implica un cambio en pH de la mezcla, añadir ácido tricloroacético (TCA) o sulfato de amonio a la mezcla, cambiar la fuerza iónica de la mezcla aumentando o disminuyendo la concentración inorgánica de sales de la mezcla, calentar la mezcla para hacer que

coagulen la proteína transportadora y/o el antígeno, o irradiar la mezcla con flujo suficiente de radiación ionizante para producir la reticulación.

En realizaciones deseables del segundo aspecto de la invención, la relación molar del antígeno con respecto a la proteína transportadora está entre 1 a 10 y 9 a 10 en la composición de vacuna.

- 5 En realizaciones deseables adicionales del segundo aspecto de la invención, la proteína transportadora es un multímero. Deseablemente, el multímero contiene al menos 5 subunidades. En otras realizaciones deseables, el multímero es un homomultímero.

10 En realizaciones deseables adicionales del segundo aspecto de la invención, las proteínas transportadoras están unidas no covalentemente. Deseablemente, el enlace no covalente implica una interacción hidrófoba, interacción iónica, interacción de van der Waals, o enlace de hidrógeno.

15 En realizaciones deseables adicionales del segundo aspecto de la invención, la proteína transportadora es toxina diftérica o un mutante de la misma, toxoide diftérico, toxina tetánica o un mutante de la misma, toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante de la misma, subunidad B de la toxina del cólera, fragmento C de la toxina tetánica, flagelina bacteriana (por ejemplo, proteína flagelina de *Vibrio cholerae*), neumolisina, listeriolisina O, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli*, toxina de tipo Shiga (proteína StxB2 de *Shigella*), proteína LTB humana, un extracto de proteína de células bacterianas completas (por ejemplo, células de *Pseudomonas aeruginosa* o estreptocócicas), el mutante negativo dominante (DNI) del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*. En realizaciones particularmente deseables, la proteína transportadora es neumolisina, listeriolisina O, toxina diftérica, toxoide diftérico, toxina tetánica, o toxoide tetánico.

20 En otras realizaciones deseables del segundo aspecto de la invención, el antígeno de interés es un polisacárido, un polialcohol, o un poliaminoácido. Deseablemente, el polisacárido contiene al menos 18 restos. En otras realizaciones deseables, el polisacárido es un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*, polisacárido de *Francisella tularensis*, polisacárido de *Bacillus anthracis*, polisacárido de *Haemophilus influenzae*, polisacárido de *Salmonella typhi*, polisacáridos de especies de *Shigella*, polisacáridos de especies de *Salmonella*, o polisacárido de *Neisseria meningitidis*. En realizaciones particularmente deseables, el polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* es uno cualquiera del tipo capsular 1-48, por ejemplo, 3, 4, 6B, 7A, 7B, 7C, 7F, 9A, 9L, 9N, 9V, 12A, 12B, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 17, 18B, 18C, 19F, 23F, 25A, 25F, 33F, 35, 37, 38, 44 o 46. En otras realizaciones particularmente deseables, el polisacárido de *Francisella tularensis* es el antígeno O.

30 En realizaciones deseables adicionales del segundo aspecto de la invención, el antígeno de interés como se reivindica es un polímero capsular microbiano. Deseablemente, el polímero capsular microbiano es ácido poligamma-D-glutámico de *Bacillus anthracis*.

Deseablemente, el antígeno de interés deriva de un microbio. En otras realizaciones deseables, el antígeno de interés no se produce en la naturaleza.

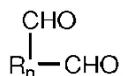
35 En realizaciones deseables adicionales del segundo aspecto de la invención, la mezcla en la etapa (i) implica un segundo antígeno de interés o incluso un tercer antígeno de interés.

40 En el tercer aspecto, la invención caracteriza otro método de preparación de una composición de vacuna. Este método implica (i) mezclar un antígeno de interés con una proteína transportadora y (ii) añadir un conector que reticule la proteína transportadora, donde no más del 50% del antígeno de interés está reticulado con la proteína transportadora en la composición de vacuna.

45 En realizaciones deseables del tercer aspecto de la invención, la composición de vacuna adicional incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones deseables del tercer aspecto de la invención, la relación molar del antígeno con respecto a la proteína transportadora está entre 1 a 10 y 10 a 1 en la composición de vacuna. En realizaciones deseables adicionales del tercer aspecto de la invención, la proteína transportadora es un multímero. Deseablemente, el multímero contiene al menos 5 subunidades. En otras realizaciones deseables, el multímero es un homomultímero.

50 En realizaciones deseables adicionales del tercer aspecto de la invención, el método implica reducir una base de Schiff en la proteína transportadora. En aún realizaciones deseables adicionales del tercer aspecto de la invención, la proteína transportadora está unida covalentemente a al menos otra proteína transportadora. Deseablemente, el enlace covalente implica un enlace peptídico entre un grupo amino primario de una cadena lateral de lisina y un grupo carboxi de una cadena lateral de aspartato o glutamato. En otras realizaciones deseables, el enlace covalente implica un reticulante bifuncional. Deseablemente, el reticulante bifuncional es glutaraldehído, bis[sulfosuccinimidil]suberato, o adipimidato de dimetilo.

En realizaciones deseables adicionales del tercer aspecto de la invención, el conector es un compuesto de fórmula



5 donde R_n es un alquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, -
 (CH₂CH₂O)_qCH₂CH₂- en la que q es 1 a 4.

En otras realizaciones deseables del tercer aspecto de la invención, el conector es glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida, o bencidina bis-biazotizada.

10 En realizaciones deseables adicionales del tercer aspecto de la invención, la proteína transportadora es toxina diftérica o un mutante de la misma, toxoide diftérico, toxina tetánica o un mutante de la misma, toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante de la misma, subunidad B de la toxina del cólera, fragmento C de la toxina tetánica, flagelina bacteriana (proteína flagelina de *Vibrio cholerae*), neumolisina, listeriolisina O, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli*, toxina de tipo Shiga (proteína StxB2 de *Shigella*), proteína LTB humana, un extracto de proteína de células bacterianas completas (células de *Pseudomonas aeruginosa* o estreptocócicas), el mutante negativo dominante (DNI) del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-lactosidasa de *Escherichia coli*.

20 En realizaciones deseables adicionales del tercer aspecto de la invención, el antígeno de interés es un polisacárido, un polialcohol, o un poliaminoácido. Deseablemente, el polisacárido contiene al menos 18 restos. En otras realizaciones deseables, el polisacárido es un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*, polisacárido de *Francisella tularensis*, polisacárido de *Bacillus anthracis*, polisacárido de *Haemophilus influenzae*, polisacárido de *Salmonella typhi*, polisacáridos de especies de *Shigella*, polisacáridos de especies de *Salmonella*, o polisacárido de *Neisseria meningitidis*. En realizaciones particularmente deseables, el polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* es uno cualquiera del tipo capsular 1-48, por ejemplo, 3, 4, 6B, 7A, 7B, 7C, 7F, 9A, 9L, 9N, 9V, 12A, 12B, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 17, 18B, 18C, 19F, 23F, 25A, 25F, 33F, 35, 37, 38, 44 o 46. En otras realizaciones particularmente deseables, el polisacárido de *Francisella tularensis* es el antígeno O.

En otras realizaciones deseables del tercer aspecto de la invención, el antígeno de interés es un polímero capsular microbiano como se reivindica. Deseablemente, el polímero capsular microbiano es ácido poli-gamma-D-glutámico de *Bacillus anthracis*.

30 Deseablemente, el antígeno de interés deriva de un microbio. En realizaciones deseables adicionales, el antígeno de interés no se produce en la naturaleza.

En realizaciones deseables adicionales del tercer aspecto de la invención, la mezcla en la etapa (i) implica un segundo antígeno de interés o incluso un tercer antígeno de interés.

35 En el cuarto aspecto, la divulgación caracteriza un método de vacunación de un sujeto contra un agente infeccioso. Este método implica administrar una composición de vacuna del primer aspecto de la invención a un sujeto en una cantidad suficiente para inducir la producción de anticuerpos en el sujeto. En realizaciones deseables del cuarto aspecto de la invención, el método implica una segunda etapa de administración donde la composición de vacuna del primer aspecto de la invención se administra al sujeto en una cantidad suficiente para reforzar la producción de anticuerpos en el sujeto. Deseablemente, en el cuarto aspecto de la invención, la producción de anticuerpos es dependiente de linfocitos T. En otras realizaciones deseables del cuarto aspecto de la invención, la producción de anticuerpos es suficiente para prevenir o reducir la infección del sujeto por un agente infeccioso. Deseablemente, el agente infeccioso es neumococo, meningococo, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, especie de *Shigella*, especie de *Salmonella*, especies de *Acinetobacter*, especie de *Burkholderia*, o *Escherichia coli*.

45 En otras realizaciones deseables del cuarto aspecto de la divulgación, el método implica una segunda etapa de administración donde una segunda composición de vacuna que contiene un antígeno de interés se proporciona al sujeto en una cantidad suficiente para reforzar la producción de anticuerpos en el sujeto. Deseablemente, la producción de anticuerpos es suficiente para prevenir o reducir la infección del sujeto por un segundo agente infeccioso.

50 En realizaciones deseables del cuarto aspecto de la divulgación, los anticuerpos son anticuerpos IgG. En una realización deseable adicional del cuarto aspecto de la invención, el sujeto es un ser humano.

55 En realizaciones deseables de uno cualquiera de los aspectos de la invención, el polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* es uno de los tipos capsulares descritas en Kong et al. (J. Med. Microbiol. 54:35-356, 2005). Por ejemplo, el tipo capsular de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* deseablemente es 1 (por ejemplo, 1-g o 1-q), 2 (por ejemplo, 2-g, 2-q, o 2-41A), 3 (por ejemplo, 3-g, 3-q, 3-c, o 3-nz), 4, 5 (por ejemplo, 5-q, 5-c, 5-qap, o 5-g), 6A (por ejemplo, 6A-g, 6A-c1, 6A-c2, 6A-n, 6A-qap, 6A-6B-g, 6A-6B-q, o 6A-6B-s), 6B (por ejemplo, 6B-c, 6A-6B-g, 6A-

6B-q, o 6A-6B-s), 7F (por ejemplo, 7F-7A), 7A (por ejemplo, 7A-cn o 7F-7A), 7B (por ejemplo, 7B-40), 7C (por ejemplo, 7C-19C-24B), 8 (por ejemplo, 8-g o 8-s), 9A (por ejemplo, 9A-9V), 9L, 9N, 9V (por ejemplo, 9A-9V), 9V y 14, 10F (por ejemplo, 10F-q, 10F-ca, o 10F-10C), 10A (por ejemplo, 10A-17A o 10A-23F), 10B (por ejemplo, 10B-10C), 11F, 11A (por ejemplo, 11A-nz o 11A-11D-18F), 11B (por ejemplo, 11B-11C), 11C (por ejemplo, 11B-11C o 11C-cn), 11D (por ejemplo, 11A-11D-18F), 12F (por ejemplo, 12F-q o 12F-12A-12B), 12A (por ejemplo, 12A-cn, 12A-46, o 12F-12A-12B), 12B (por ejemplo, 12F-12A-12B), 13 (por ejemplo, 13-20), 14 (por ejemplo, 14-g, 14-q, 14-v, o 14-c), 15F (por ejemplo, 15F-cn1 o 15F-cn2), 15A (por ejemplo, 15A-ca1, 15A-ca2, o 15A-chw), 15B (por ejemplo, 15B-c, 15B-15C, 15B-15C-22F-22A), 15C (por ejemplo, 15C-ca, 15C-q1, 15C-q2, 15C-q3, 15C-s, 15B-15C, o 15B-15C-22F-22A), 16F (por ejemplo, 16F-q o 16F-nz), 16A, 17F (por ejemplo, 17F-n y 17F-35B-35C-42), 17A (por ejemplo, 17A-ca o 10A-17A), 18F (por ejemplo, 18F-ca, 18F-w, o 11A-11D-18F), 18A (por ejemplo, 18A-nz o 18A-q), 18B (por ejemplo, 18B-18C), 18C (por ejemplo, 18B-18C), 19F (por ejemplo, 19F-g1, 19F-g2, 19F-g3, 19F-q, 19F-n, o 19F-c), 19A (por ejemplo, 19A-g, 19A-, o 19A-ca), 19B, 19C (por ejemplo, 19C-cn1, 19C-cn2, o 7C-19C-24B), 20 (por ejemplo, 13-20), 21 (por ejemplo, 21-ca o 21-cn), 22F (por ejemplo, 15B-15C-22F-22A), 23F (por ejemplo, 23F-c, 10A-23F, o 23F-23A), 23B (por ejemplo, 23B-c o 23B-q), 24F (por ejemplo, 24F-cn1, 24F-cn2, o 24F-cn3), 24A, 24B (por ejemplo, 7C-19C-24B), 25F (por ejemplo, 25F-38), 25A, 27, 28F (por ejemplo, 28F-28A o 28F-cn), 28A (por ejemplo, 28F-28A), 29 (por ejemplo, 29-ca o 29-q), 31, 32F (por ejemplo, 32F-32A), 32A (por ejemplo, 32A-cn o 32F-32A), 33F (por ejemplo, 33F-g, 33F-q, 33F-chw, 33F-33B, o 33F-33A-35A), 33A (por ejemplo, 33F-33A-35A), 33B (por ejemplo, 33B-q, 33B-s, o 33F-33B), 33D, 34 (por ejemplo, 34-ca o 34s), 35F (por ejemplo, 35F-47F), 35A (por ejemplo, 33F-33A-35A), 35B (por ejemplo, 17F-35B-35C-42), 36, 37 (por ejemplo, 37-g o 37-ca), 38 (por ejemplo, 25F-38), 39 (por ejemplo, 39-cn1 o 39-cn2), 40 (por ejemplo, 7B-40), 41F (por ejemplo, 41F-cn o 41F-s), 41A (por ejemplo, 2-41A), 42 (por ejemplo, 17B-35B-35C-42), 43, 44, 45, 46 (por ejemplo, 46-s o 12A-46), 47F (por ejemplo, 35F-47F), 47A, 48 (por ejemplo, 48-cn1 o 48-cn2), o Número de acceso de GenBank AF532714 o AF532715.

Definiciones

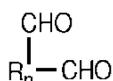
Por "administrar", como se usa en el presente documento conjuntamente con una vacuna, se indica proporcionar a un sujeto una vacuna en una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto, donde la respuesta inmunitaria produce la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno contenido en la vacuna. La administración incluye deseablemente inyección intramuscular, inyección intradérmica o inyección transcutánea y, deseablemente implica la administración de adyuvantes inmunitarios apropiados. La administración puede implicar una única administración de una vacuna o la administración de una vacuna en múltiples dosis. Deseablemente, una segunda administración se diseña para reforzar la producción de anticuerpos en un sujeto para prevenir la infección por un agente infeccioso. La frecuencia y cantidad de dosificación de vacuna depende de la actividad específica de la vacuna y puede ser fácilmente determinada por experimentación rutinaria.

Por "reticulación" se indica la formación de un enlace covalente entre dos moléculas, macromoléculas, o combinación de moléculas, por ejemplo, proteínas transportadoras, ya sea directamente, cuando se usa un conector de "longitud cero", como por el uso de una tercera molécula, el conector químico, que tiene dos grupos funcionales cada uno capaz de formar un enlace covalente con una de dos moléculas separadas o entre dos grupos separados en la misma molécula (es decir, éstos formarían "bucles" que podrían también envolver el polímero). Conectores a modo de ejemplo incluyen conectores bifuncionales que son capaces de reticular dos proteínas transportadoras. La reticulación también puede producirse entre un antígeno y una proteína transportadora.

Por "antígeno", como se usa en el presente documento, se indica cualquier molécula o combinación de moléculas que se une específicamente por un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

Por "conector bifuncional", como se usa en el presente documento, se indica un compuesto que tiene dos grupos funcionales cada uno por separado capaz de formar un enlace covalente con dos moléculas separadas, átomos, o conjuntos de moléculas. Conectores bifuncionales a modo de ejemplo se describen, por ejemplo, por G. T. Hermanson (Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996) y Dick y Beurret (Conjugate Vaccines. Contribu. Microbiol. Immunol., Karger, Basal 10:48-114, 1989). Deseablemente, un conector bifuncional es glutaraldehído, bis[sulfosuccinimidil]suberato, o adipimidato de dimetilo.

Por un "conector", como se usa en el presente documento, se indica un compuesto o un enlace químico que une covalentemente dos o más moléculas. Deseablemente, un conector es glutaraldehído o un compuesto de fórmula



donde R_n es un alquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ en la que q es 1 a 4. La unión puede ser directa sin el uso de una molécula de unión. Por ejemplo, un grupo carboxilo de proteína puede unirse directamente a su grupo amino usando química de carbodiimida o enzimáticamente usando transglutaminasas que catalizan la reticulación de este tipo.

Por "reforzar la producción de anticuerpos" se indica la activación de linfocitos B de memoria que se producen durante una segunda exposición a un antígeno, llamada una "respuesta de refuerzo", y es indicativa de una respuesta inmunitaria de memoria "secundaria" de larga duración, produciendo la producción de larga duración de anticuerpos.

- 5 Por "proteína transportadora" se indica una proteína usada en una vacuna que provoca una respuesta inmunitaria a ella misma y/o a un antígeno complejado con una proteína transportadora. Deseablemente, el antígeno no está covalentemente asociado a la proteína transportadora por estar atrapado en un complejo con la proteína transportadora. Sin embargo, el antígeno y la proteína transportadora también pueden unirse covalentemente entre sí. Deseablemente, la proteína transportadora contiene un epítipo reconocido por un linfocito T. También están englobadas por la definición de una "proteína transportadora" péptidos multi-antigénicos (MAP), que son péptidos ramificados. Deseablemente, una MAP incluye lisina. Proteínas transportadoras deseables a modo de ejemplo incluyen toxinas y toxoides (químicos o genéticos), que pueden ser mutantes. Deseablemente, una proteína transportadora es toxina diftérica o un mutante de la misma, toxoide diftérico, toxina tetánica o un mutante de la misma, toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante de la misma, subunidad B de la toxina del cólera, fragmento C de la toxina tetánica, flagelina bacteriana, neumolisina, listeriolisina O (y moléculas relacionadas), una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli*, toxina de tipo Shiga, proteína LTB humana, un extracto de proteína de células bacterianas completas, el mutante negativo dominante (DNI) del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*, o cualquier otra proteína que pueda ser reticulada por un conector.

Por "DNI" se indica la proteína mutante negativa dominante (DNI), que es una forma mutada de antígeno protector (PA) de *B. anthracis*, como se describe por Benson et al. (Biochemistry 37:3941-3948, 1998).

- 25 Por "atrapado", como se usa en el presente documento en referencia a un antígeno, se indica un antígeno que sigue en un complejo con proteínas transportadoras en condiciones fisiológicas. Deseablemente, el antígeno es atrapado en un complejo con proteínas transportadoras en ausencia de enlace covalente significativo entre el antígeno y una proteína transportadora. La ausencia de enlace covalente significativo, como se usa en el presente documento, se refiere a no más del 50 % del antígeno que se une covalentemente a una proteína transportadora. Deseablemente, no más del 40 %, 30 %, 10 % o del 5 % del antígeno está covalentemente unido a una proteína transportadora.

- 30 Por "infección" se indica la invasión de un sujeto por un microbio, por ejemplo, una bacteria, hongo, parásito, o virus. La infección puede incluir, por ejemplo, la excesiva multiplicación de microbios que normalmente están presentes en o sobre el cuerpo de un sujeto o la multiplicación de microbios que normalmente no están presentes en o sobre un sujeto. Un sujeto está padeciendo una infección microbiana cuando una cantidad excesiva de una población microbiana está presente en o sobre el cuerpo del sujeto o cuando la presencia de una población (poblaciones) microbiana(s) están dañando las células o causando síntomas patológicos a un tejido del sujeto.

- 35 Por "agente infeccioso" se indica un microbio que produce una infección.

Por "inmunogénico" se indica un compuesto que induce una respuesta inmunitaria, en un sujeto. Deseablemente, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T que implica la producción de anticuerpos IgG.

Por "microbio" se indica una bacteria, hongo, parásito o virus que es capaz de causar una infección en un sujeto.

- 40 Por "polímero capsular microbiano" se indica un polímero presente en o sobre el recubrimiento de cápsula de un microbio. Deseablemente, un polímero capsular microbiano es un polímero orgánico tal como un polisacárido, fosfopolisacárido, polisacárido con un aminoazúcar con una sustitución de N-acetilo, polisacárido que contiene un azúcar sulfanilado, otro azúcar modificado con sulfato, o azúcar modificado con fosfato, polialcohol, poliaminoácido, ácido teicoico, y una cadena lateral O de un lipopolisacárido.

- 45 Por "monómero" se indica una estructura molecular capaz de formar dos o más enlaces con monómeros similares, frecuentemente dando una cadena o una serie de cadenas conectadas ramificadas de subestructuras de monómero de repetición, cuando es parte de un "polímero".

- 50 Por "polímero orgánico" se indica un polímero compuesto de monómeros covalentemente unidos que tienen cada uno tres o más de los siguientes átomos: carbono, oxígeno, hidrógeno, fosfato, nitrógeno y sulfato. Deseablemente, un polímero orgánico es un polisacárido, fosfopolisacárido, polisacárido con un aminoazúcar con una sustitución de N-acetilo, polisacárido que contiene un azúcar sulfanilado, otro azúcar modificado con sulfato, o azúcar modificado con fosfato, azúcar, polialcohol, poliaminoácido, ácido teicoico, y una cadena lateral O de lipopolisacárido.

- 55 Por "polialcohol" se indica una forma hidrogenada de un hidrato de carbono donde un grupo carbonilo ha sido reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario. Polialcoholes a modo de ejemplo son un poli(óxido de alquileo) (POA), tal como un polialquilenglicol (PAG), que incluye polimetilenglicoles, polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles; poli(alcohol vinílico) (PVA); polietileno-co-anhídrido de ácido maleico; poliestireno-co-anhídrido de ácido málico; dextranos que incluyen carboximetil-dextranos; celulosas, que

5 incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa; hidrolizados de quitosano; almidones tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones; glucógeno; agarosas y derivados de las mismas; goma guar; pululano; inulina; goma xantana; carragenina; pectina; hidrolizados de ácido alginico; sorbitol; un alcohol de glucosa, manosa, galactosa, arabinosa, gulosa, xilosa, treosa, sorbosa, fructosa, glicerol, maltosa celobiosa, sacarosa, amilosa, amilopeptina; o monopropilenglicol (MPG).

Por "poliaminoácido" se indica al menos dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Deseablemente, un poliaminoácido es un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos repetitiva o una cadena del mismo aminoácido (es decir, un homopolímero).

10 Por "reducir una base de Schiff" se indica exponer azometina o un compuesto de fórmula $R_1R_2C=N-R_3$ (donde R_1 , R_2 y R_3 son subestructuras químicas, normalmente que contienen átomos de carbono) a un agente reductor que satura el doble enlace de la base de Schiff con átomos de hidrógeno. Métodos de reducción son conocidos para aquellos expertos en la materia.

15 Por "se une específicamente a", como se usa en el presente documento en referencia a un anticuerpo o un fragmento del mismo, se indica una elevada afinidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo por una proteína particular, por ejemplo, un antígeno, con respecto a una cantidad igual de cualquier otra proteína. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene deseablemente una afinidad por su antígeno que es al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces, o 100 veces más de aquella por una cantidad igual de cualquier otro antígeno, que incluye antígenos relacionados, como se determina usando métodos convencionales tales como un ensayo de inmunoadsorción de adsorción (ELISA).

20 Por "sujeto" se indica un animal que puede infectarse por un microbio. Deseablemente, un sujeto es un mamífero tal como un ser humano, mono, perro, gato, ratón, rata, vaca, oveja, cabra o caballo. En una realización deseable, el sujeto es un ser humano, tal como un niño humano. Deseablemente, el sujeto es un lactante humano, lactante mayor, o niño prepuberal.

25 Por "antígeno independiente de linfocitos T" se indica un antígeno que produce la generación de anticuerpos sin la cooperación de linfocitos T. El antígeno independiente de linfocitos T estimula deseablemente directamente los linfocitos B sin la cooperación de linfocitos T. Antígenos independientes de linfocitos T deseables a modo de ejemplo incluyen ácido poli-gamma-D-glutámico (PGA) de antígeno capsular, ácido alginico (algenato), dextrano, polisacáridos (PS), poliaminoácidos, polialcoholes y ácidos nucleicos.

30 **Ventajas**

En comparación con las tecnologías de vacunas existentes, las vacunas obtenidas por los métodos reivindicados son simples de preparar, menos propensas a problemas químicos, menos propensas a problemas inmunológicos, menos caras, más adaptables a diferentes antígenos de interés y proteínas transportadoras que la tecnología de conjugados, y más flexible de crear vacunas multivalentes (vacunas protectoras contra múltiples antígenos).

35 Las vacunas de la presente divulgación no requieren enlace covalente entre una proteína transportadora y el antígeno previsto para provocar una respuesta inmunitaria, simplificando así el método de su preparación y reduciendo el coste de su preparación en comparación con la tecnología de vacunas conjugadas. Las vacunas conjugadas de polisacárido (PS)-proteína han sido prohibitivamente caras de producir y vender en los países en vías de desarrollo; las vacunas conjugadas convencionales son difíciles de producir a precio bajo debido a la química altamente especializada requerida para cada vacuna y los costes de producción y purificación de tanto el PS como la proteína transportadora.

40 Las vacunas de la presente divulgación también tratan una necesidad de vacunas que pueden inducir con seguridad inmunidad contra antígenos previamente resistentes al tratamiento. Tales vacunas pueden ser monovalentes (que tienen antígenos únicos para inducir una respuesta inmunitaria) o multivalentes (que tienen múltiples antígenos para inducir múltiples respuestas inmunitarias). Se ha mostrado que vacunas que contienen ligandos de TLR (receptor del tipo toll) provocan respuestas inmunitarias para antígenos de otro modo resistentes al tratamiento, pero tienden a ser no seguras debido a que los ligandos de TLR son frecuentemente proinflamatorios, tóxicos a dosis incluso pequeñas, reactogénicos y probablemente producen síntomas adversos en comparación con las vacunas de la invención.

50 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente Descripción detallada, los dibujos, y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 La Figura 1 es un diagrama esquemático de una vía propuesta no limitante para la inducción de una respuesta inmunitaria IgG anti-PS por una vacuna conjugada para un conjugado hecho entre un PS y la proteína transportadora toxoide tetánico. En este modelo, solo linfocitos B que presentan receptores de anticuerpo que

reconocen el PS se unen al conjugado de PS-proteína. Así, la proteína transportadora está unida a la superficie del linfocito B que presenta la especificidad de unión a PS correcta.

La Figura 2 es una imagen de análisis de transferencia Western de preparaciones de PCMV y de control monitorizadas para la reticulación por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y transferencia Western con antisuero anti-PA. La proteína DNI migra a 84 kDa antes de la reticulación con glutaraldehído. PCVM1-PCMV3 (carriles 1-3) muestran una amplia reticulación de la proteína DNI como se evidencia por la migración de bandas a masas moleculares superiores a 220 kDa. La proteína DNI sola reticulada en ausencia de PGA también muestra las mismas especies de peso molecular alto (carril 5). A diferencia, DNI mezclada con PGA pero no tratada con glutaraldehído muestra bandas que co-migran con DNI o especies de peso molecular más bajo (carril 4).

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de ELISA usados para medir las respuestas inmunitarias anti-DNI específicas de IgM e IgG en ratones inmunizados con tres preparaciones de PCMV (PCMV1-PCMV3; preparaciones 1-3) y las dos preparaciones de control de antígeno 4 y 5. La proteína DNI fue altamente inmunogénica en todas las preparaciones, excepto la preparación de control 4 que no se reticuló con glutaraldehído (glut). Sin embargo, estas respuestas inmunitarias específicas de DNI se basaron exclusivamente en IgG. Aunque no se detectó IgM anti-DNI incluso en el día 7 de la inmunización, pudo detectarse una respuesta de IgG anti-DNI significativa en ratones inmunizados con preparaciones de PCMV en el día 17 y aquellos inmunizados con DNI reticulada solo (preparación 5). Se observó una fuerte respuesta de refuerzo contra DNI en el día 30 con todas las preparaciones, incluyendo la preparación 4

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de ELISA usados para medir las respuestas inmunitarias anti-PGA específicas de IgM en ratones inmunizados con las tres preparaciones de PCMV (PCMV1 - PCMV3; preparaciones 1-3) y las dos preparaciones de control de antígeno 4 y 5. Respuestas IgM anti-PGA mostraron un patrón que era típico de un polímero capsular. La preparación de control 4 generó una respuesta de IgM anti-PGA detectable en el día 7, pero esta respuesta no se reforzó en el día 17 o día 30. Todas las preparaciones de PCMV indujeron una respuesta de IgM anti-PGA en el día 7 y luego generaron exclusivamente respuestas de IgM anti-PGA incluso más fuertes en los días 17 y 30. Como era de esperar, la preparación de control 5 (DNI reticulada solo) no generó respuesta anti-PGA ni basada en IgM ni en IgG.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de ELISA usados para medir la respuesta inmunitaria de anti-PGA específica de IgG en ratones inmunizados con las tres preparaciones de PCMV (PCMV1 - PCMV3; preparaciones 1-3) y las dos preparaciones de control de antígeno 4 y 5. PCMV1-3 generaron fuertes respuestas anti-PGA basadas en IgG que fueron evidentes en el día 17 y luego se reforzaron claramente en el día 30.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la pre-inmunización con título de IgM de suero reunido y 30 días después de la inmunización con PCMV que contienen DNI y alginato (DNI-ALG C, DNI-ALG A) y una preparación de PCMV trivalente de "una sola etapa" que contiene DNI complejada con alginato (ALG), dextrano (DEX) y PGA.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el título de anticuerpos IgG de suero específica de antígeno 60 días después de la inmunización con PCMV que contienen DNI y alginato (DNI-ALG C, DNI-ALG A) y una preparación de PCMV trivalente de "una sola etapa" que contiene DNI complejada con alginato (ALG), dextrano (DEX) y PGA.

La Figura 8 es un gráfico que muestra el título de anticuerpos IgG anti-PS 128 días después de la inmunización con PCMV que contienen DNI y alginato (DNI-ALG C, DNI-ALG A) y una preparación de PCMV trivalente de "una sola etapa" que contiene DNI complejada con alginato (ALG), dextrano (DEX) y PGA.

Las Figuras 9A y 9B son gráficos de ensayos de IL-6 usando polisacáridos (pss) de *S. pneumoniae* obtenidos de la Colección Americana de Cultivos Tipo y fabricados por Merck o de Serum Institute of India (SII).

La Figura 10 es un gráfico que muestra que el contaminante en pss 6B obtenido de SII puede eliminarse usando el tratamiento 2 (trt 2; una hora de incubación a 80 °C en NaOH 1 M). El tratamiento 1 (trt 1) es una serie de cinco extracciones en fenol para eliminar la proteína del polisacárido.

La Figura 11 es un gráfico que muestra que PCMV que contienen pss 6B son más eficaces en inducir la producción de IgG que Pevnar®. BSA = Albúmina de suero bovino; DT = Toxina diftérica; DTx = Toxoide diftérico; y TTx = Toxoide tetánico.

La Figura 12 es un gráfico que muestra que PCMV que contienen pss 6B son tan eficaces como Pevnar® en la inducción de la producción de IgM.

La Figura 13 es un gráfico que muestra que PCMV que contienen pss 6B son más eficaces en inducir la producción de IgG que Pevnar®.

La Figura 14-16 son gráficos que muestran que PCMV que contienen pss 14 son aproximadamente equivalentes a Pevnar® en inducir la producción de IgG (DTx = Toxide diftérico; TTx = Toxide tetánico).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se define por las reivindicaciones.

5 La invención caracteriza composiciones de vacuna y métodos de preparación y administración de tales composiciones para proporcionar inmunidad contra antígenos independientes de linfocitos T o antígenos que normalmente provocan respuestas inmunitarias débiles tales como, por ejemplo, polisacáridos (PS), polialcoholes, poliaminoácidos, y otros polímeros orgánicos. Las vacunas de la invención tienen las potentes propiedades inmunológicas de vacunas conjugadas de PS-proteína típicas, pero deseablemente se diferencian de las vacunas conjugadas en que no se requiere enlace atómico covalente significativo para acoplar el antígeno de interés, por ejemplo, PS o polímero orgánico capsular, a la proteína transportadora. Más bien, el antígeno de interés, por ejemplo, PS o polímeros orgánicos capsulares, es atrapado con la proteína transportadora. Por ejemplo, puede formarse una matriz de proteína por moléculas de proteína transportadora de reticulación covalente con ellas mismas en presencia de antígeno soluble, por ejemplo, PS o polímeros orgánicos capsulares: estas vacunas se denominan vacunas de matriz de proteína. Las proteínas transportadoras que están altamente reticuladas entre sí pueden formar una matriz que puede capturar un antígeno y facilitar la captación de ese antígeno y la estimulación de la producción de anticuerpos en células inmunitarias. La matriz de proteína transportadora puede estar en forma de una "malla" que encierra el antígeno o una serie de "perlas en un hilo" donde el antígeno es el "hilo", la proteína o complejos de proteínas reticuladas es la "perla" en esta analogía. El antígeno es atrapado con la proteína transportadora si la proteína transportadora rodea el antígeno para formar un anillo alrededor del antígeno o una malla tridimensional en la que el antígeno está enmarañado dentro. Por tanto, el transportador y el antígeno pueden ser reticulados, por ejemplo, por reticulaciones intracatenarias en la cadena de antígeno con la proteína transportadora. En realizaciones deseables, el antígeno y la proteína transportadora están unidos no covalentemente. Tal enlace no covalente puede implicar una interacción hidrófoba, interacción iónica, interacción de van der Waals, o enlace de hidrógeno. El enlace no covalente puede incluir configuraciones geométricas físicas que asocian no covalentemente el antígeno con complejos de proteína (véase: la analogía de "perla en un hilo" anterior).

La proteína transportadora no necesita estar reticulada consigo misma para atrapar un antígeno. Un antígeno también puede ser atrapado, por ejemplo, mezclando la proteína transportadora y el antígeno en una disolución acuosa y precipitando la proteína transportadora, co-precipitando así el antígeno con la proteína. Un antígeno también puede ser atrapado con una proteína transportadora precipitando un compuesto (por ejemplo, alumbre, hexametafosfato de sodio, polifosfazeno, u otros polímeros con afinidad por proteínas conducidas por interacciones hidrófobas o iónicas) de una mezcla de antígeno y proteína transportadora. Métodos de precipitación de proteínas son estándar en la materia e incluyen, por ejemplo, (1) cambiar el pH de la mezcla, (2) cambiar la fuerza iónica de la disolución aumentando o disminuyendo la concentración inorgánica de sales de la mezcla, (3) o añadir ácido tricloroacético (TCA) o sulfato de amonio a la mezcla, (4) calentar la mezcla para hacer que la proteína coagule (es decir, forme un precipitado o gel), (5) modificar químicamente la proteína en la mezcla de forma que la convierta en insoluble, y (6) irradiar la disolución de proteína con un flujo suficiente de radiación ionizante (ultravioleta, gamma, o rayos beta) como para producir la reticulación y/o precipitación de la proteína, entre otros.

40 Cuando se usa una proteína capsular de un patógeno, tales vacunas se llaman vacunas de matriz de proteína capsular (PCMV). Como se describe en los ejemplos, se produjeron PCMV que incluyen las basadas en el modelo de antígeno capsular independiente de T, ácido poli-gamma-D-glutámico (PGA), además de ácido algínico (alginato) y dextrano, y la proteína transportadora a modo de ejemplo, DNI. La PCMV de PGA era simple de preparar en gran cantidad y se encontró que indujo respuestas inmunitarias típicas de vacunas conjugadas de PGA-proteína. Las vacunas de la invención pueden prepararse usando cualquiera de muchos posibles conectores para reticular cualquiera de muchas proteínas transportadoras posibles en presencia de cualquier antígeno de interés. Conectores a modo de ejemplo y preferidos, proteínas transportadoras y antígenos de interés se tratan en el presente documento.

Los polisacáridos (PS) son polímeros de sacáridos (azúcares). Los PS derivados de cápsulas son los componentes antigénicos primarios implicados en la inmunidad protectora contra patógenos bacterianos encapsulados tales como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Haemophilus influenzae* tipo B. La inmunización de adolescentes y adultos con vacunas basadas en PS microbiano ha sido satisfactoria en reducir la carga de enfermedad, pero ha demostrado ser menos eficaz en proporcionar inmunidad protectora para lactantes y niños jóvenes (es decir, niños de menos de 24 meses de edad). Los niños jóvenes todavía no han desarrollado un repertorio inmunitario adaptativo maduro y antígenos independientes de linfocitos T tales como el PS capsular son poco inmunogénicos y no conducen a respuestas inmunitarias protectoras a largo plazo (es decir, respuesta de memoria inmunológicas) en tales receptores jóvenes de la vacuna.

Un antígeno independiente de linfocitos T tal como PS puede convertirse en un antígeno dependiente de linfocitos T por acoplamiento químico de PS a proteína; este proceso se llama "conjugación" e implica la formación de enlaces covalentes entre los átomos en la estructura de PS y los átomos de la cadena lateral de aminoácidos presentes en la proteína "transportadora". Tales "vacunas conjugadas" promueven más eficientemente la inducción de la

maduración de linfocitos B y el cambio de isotipo que conduce a niveles mucho más altos de anticuerpo con el perfil protector anti-PS correcto. Los anticuerpos protectores tienen alta afinidad por sus antígenos de PS, y normalmente son de la subclase de inmunoglobulina G (IgG), un anticuerpo de larga duración con fijación del complemento y actividad de efector opsónico.

5 Una vía no limitante a modo de ejemplo para la inducción de una respuesta inmunitaria de IgG anti-PS por un conjugado hecho entre un PS y la proteína transportadora toxoide tetánico se muestra en la Figura 1. En este modelo, solo linfocitos B que muestran receptores de anticuerpo que reconocen el PS se unen al conjugado de PS-proteína. Así, la proteína transportadora está unida a la superficie del linfocito B que muestra la especificidad de unión de PS correcta. El complejo de proteína-PS es recogido por estos linfocitos B en el compartimento vacuolar intracelular donde el transportador es procesado por degradación proteolítica. Péptidos derivados de la proteína transportadora son transportados y cargados en la ranura de presentación del receptor de clase II de MHC (MHC-II). Este complejo de MHC-II-péptido transportador es presentado sobre la superficie del linfocito B. Tras el reconocimiento del complejo de MHC-II-péptido por el receptor de linfocitos T (TCR), los linfocitos T se activan y secretan citocinas que proporcionan "ayuda" para la inducción de la diferenciación de linfocitos B. Los linfocitos B se expanden en números y se diferencian en "células plasmáticas", que ahora secretan el anticuerpo. Inicialmente, la inmunoglobulina M (IgM) se produce por células plasmáticas, pero con el tiempo el linfocito T ayuda a hacer que las células plasmáticas cambien de clase y produzcan otras clases de isotipo de anticuerpo tales como IgG. Este proceso continúa con células plasmáticas que experimentan cambios mutacionales que conducen a la producción de receptores de anticuerpo que tienen afinidad incluso más alta por los conjugados de PS-proteína. A medida que el antígeno es eliminado, solo las células plasmáticas de afinidad más alta son activadas por el conjugado residual de PS-proteína que queda en la circulación. El proceso de maduración dependiente de linfocitos T de células plasmáticas continúa, conduciendo a la expansión de poblaciones de células plasmáticas que producen anticuerpos de alta afinidad de la clase de IgG. La expansión puede ser fácilmente monitorizada midiendo los niveles de anticuerpos IgG anti-PS en el suero de un sujeto inmunizado, por ejemplo, un ser humano.

25 Con el tiempo, el proceso de maduración y cambio conduce a la producción de linfocitos B de memoria que son de larga duración y específicos para el PS. Los linfocitos B de memoria tienen una propiedad única por que pueden ser inmediatamente activados si se exponen a PS. La activación hace que los linfocitos B de memoria se multipliquen y produzcan rápidamente IgG anti-PS. La activación de los linfocitos B de memoria que se produce durante una segunda exposición a antígeno de PS se llama una "respuesta de refuerzo" y es indicativa de una respuesta inmunitaria de memoria "secundaria" de larga duración. La inmunización primaria pueda estimular la producción de anticuerpos IgM y algunos anticuerpos IgG. Tras la inmunización secundaria, es decir, la dosis de "refuerzo", las células de memoria ya programadas por la primera inmunización se estimulan para producir grandes cantidades de IgG, la respuesta inmunitaria de memoria.

35 Un antígeno independiente de linfocitos T generalmente no estimula la inmunidad duradera, es decir, la producción de anticuerpos IgG, pero puede estimular la producción de anticuerpos IgM menos potentes y más temporales. Como tal, el antígeno de PS solo no produce normalmente respuestas de refuerzo de IgG. Sin embargo, el PS produce respuestas de refuerzo si la inmunización primaria se realiza con un conjugado de PS-proteína debido a que células de memoria inducidas por el conjugado ya han sido programadas para producir IgG. De hecho, se cree que la respuesta de refuerzo en animales o seres humanos vacunados imita la respuesta protectora debido a la exposición a un microbio que presenta el PS; esta memoria a largo plazo es crítica para una vacuna que funciona en la producción de sujetos inmunizados años después de su inmunización con vacunas conjugadas. Así, los conjugados de PS-proteína son valiosos por (1) su capacidad para inducir altos niveles de IgG contra antígenos de PS, y (2) su capacidad para inducir respuestas inmunitarias de memoria contra antígenos de PS. Los antígenos de PS normalmente no muestran estas propiedades y así son antígenos inferiores. La dificultad en la síntesis de vacunas conjugadas y su coste de producción ha ralentizado el desarrollo de vacunas conjugadas para muchas enfermedades bacterianas donde una respuesta inmunitaria a PS puede ser protectora.

Otros antígenos independientes de linfocitos T incluyen homopolímeros de aminoácidos, tales como ácido poli-gamma-D-glutámico (PGA), y polialcoholes. De hecho, la mayoría de los polímeros biológicos son antígenos independientes de linfocitos T. Los polímeros pueden reticular receptores de inmunoglobulina (Ig) en linfocitos B que los reconocen debido a la naturaleza repetitiva de sus estructuras químicas (y así epítopes). Así, los polímeros pueden activar los linfocitos B para la producción de IgM anti-polímero de la misma forma que lo hacen los polisacáridos. Por ejemplo, un homopolímero de aminoácido, ácido poli-gamma-D-glutámico (PGA) de *Bacillus anthracis*, es un polímero capsular que es poco inmunogénico y también un antígeno independiente de linfocitos T. Vacunas compuestas de PGA conjugado con transportadores de proteína son altamente inmunogénicas, capaces de inducir IgG anti-PGA, y memoria inmunológica a PGA. Por lo tanto, la mayoría de los polímeros responden como PS en términos de su inmunogenicidad debido a que no pueden procesarse y presentarse en el contexto de MHC-II y así no pueden reclutar la ayuda de linfocitos T. Una excepción se encuentra en algunos polímeros que existen de forma natural que interaccionan con otra clase de receptor llamados los receptores del tipo toll (TLR). Una vez activados, los TLR pueden inducir la producción de citocinas por células hospedadoras y producir cambios en la respuesta inmunitaria adaptativa. Algunos PS están covalentemente unidos a ligandos de TLR o contaminados con tales ligandos. Por ejemplo, los lipopolisacáridos (LPS) son PS que son altamente inmunogénicos e inducen IgG y respuestas de memoria; el resto de lípido A de LPS es un ligando de TLR y puede ser responsable de las propiedades inmunológicas.

En otro ejemplo, se ha encontrado que algunos PS neumocócicos muestran algunas de las propiedades inmunológicas de vacunas conjugadas por que inducen cambio de isotipo a IgG aunque no estén unidos a un transportador de proteína. Recientemente, se encontró que la vacuna de polisacárido comercial Pneumovax-23, además de PS individuales de diversas cepas de *Streptococcus pneumoniae*, estaba contaminada con ligandos de TLR (Sen et al., J. Immunol. 175:3084-3091, 2005). Este hallazgo puede explicar por qué estas preparaciones de PS pueden inducir cambio de isotipo a IgG en ausencia de conjugación de proteína. Estos PS neumocócicos indujeron la secreción de IL-6 y TNF- α por macrófagos. Sin embargo, purificación adicional del PS por extracción con fenol abolió la secreción de citocinas de macrófagos. En estudios de inmunización, los PS extraídos con fenol fueron poco inmunogénicos y ya no indujeron una IgG anti-PS. Así, la extracción con fenol elimina las moléculas contaminantes que fueron responsables de estas propiedades inmunogénicas poco usuales de esta preparación de PS. Las moléculas contaminantes parecen ser ligandos de TLR dada su capacidad para activar las respuestas de citocinas dependientes de TLR en macrófagos. Purificación adicional del PS por extracción con fenol eliminó los ligandos de TLR contaminantes y convirtió el PS en totalmente independiente de linfocitos T.

El ejemplo anterior ilustra que el antígeno de PS puede actuar como antígenos del conjugado PS-proteína sin acoplamiento covalente de proteína a hidrato de carbono. Desafortunadamente, los ligandos de TLR son normalmente proinflamatorios. Por ejemplo, LPS es tóxico a dosis incluso pequeñas. Así, mientras que mezclar un ligando de TLR con un PS podría ensanchar la respuesta inmunitaria al PS, también es probable que este enfoque produzca vacuna que es reactogénica y probablemente que produzca síntomas adversos en receptores de vacuna. La tecnología de vacunas conjugadas sigue siendo el método de elección para la producción de vacuna de PS con el espectro deseado de inmunogenicidad y seguridad.

El desarrollo de vacunas conjugadas de PS-proteína ha reducido enormemente la carga de enfermedades infantiles producidas por patógenos bacterianos invasivos. Un puñado de tales vacunas que incluyen unas contra *Haemophilus influenzae* tipo B y ciertas cepas de meningococos y estreptococos están comercialmente disponibles en los países desarrollados. Estas vacunas conjugadas de PS-proteína son prohibitivamente caras de producir y vender en los países en vías de desarrollo. Por ejemplo, la vacuna conjugada 7-valente neumocócica comercialmente disponible cuesta aproximadamente 58\$ (2006, dólares estadounidenses) por dosis y requiere una pauta de cuatro dosis. El coste solo pone a esta vacuna fuera del alcance de aquellos en países en vías de desarrollo que llevan la carga de la enfermedad.

Las vacunas conjugadas convencionales son difíciles de producir a bajo coste debido a la química implicada y los costes de producción y purificación de tanto el PS como la proteína transportadora. Normalmente, ambos necesitan ser bastantes puros antes de que la química de conjugación pueda realizarse con una eficiencia de acoplamiento razonable. Normalmente, la química de acoplamiento debe ser resuelta para diversos PS que es única para la química del PS y las proteínas transportadoras que se han seleccionado. Esta química de acoplamiento introduce grupos funcionales en el PS que entonces pueden unirse a la proteína transportadora normalmente mediante las cadenas laterales del amino épsilon de los restos de lisina. La modificación química del PS para introducir tales grupos de acoplamiento puede destruir los epítopes en el PS e introducir nuevos epítopes (por ejemplo, asociados al conector o grupos de sacárido modificados) cuya significancia puede solo evaluarse realizando análisis inmunológico cuidadoso. Además, para las vacunas conjugadas de PS-proteína convencionales, el tamaño de PS, el número de moléculas de PS unidas por molécula de transportador de proteína, la naturaleza del transportador seleccionado y el tipo de química de enlace pueden todos afectar la inmunogenicidad de la vacuna conjugada. Como tal, por ejemplo, en el caso de enfermedad neumocócica donde cada uno de los + de 90 serotipos conocidos tiene una estructura de PS diferente (Bentley et al., PLOS Genetics 2(3):e31 262-269, 2006), un único método de conjugación puede no ser apropiado para todos los serotipos. Sintetizar reproduciblemente vacunas conjugadas con propiedades inmunológicas reproducibles implica el cuidadoso control del tamaño del PS, el número de moléculas de PS unidas por molécula de transportador de proteína, la naturaleza del transportador seleccionado y el tipo de química de enlace y esto, a su vez, aumenta espectacularmente el coste de fabricación de las vacunas conjugadas.

La emergencia de resistencia a antibióticos resalta la urgencia del desarrollo de vacunas seguras y eficaces. La preparación de vacunas ampliamente disponibles, especialmente para aquellos en países en vías de desarrollo, requiere que la fabricación de vacunas también sea rentable. La incorporación de vacunas conjugadas combinadas contra muchos antígenos de polisacárido de diferentes serotipos de una o más especies bacterianas en la pauta de inmunización en la infancia simplificaría la administración de vacunas en esa población de alto riesgo. Sin embargo, la actual tecnología de vacunas conjugadas no es rentable y así las vacunas conjugadas de combinación son prácticamente imposibles de administrar a los países en vías de desarrollo. De hecho, incluso en los países desarrollados con sus fuertes mercados establecidos, la reciente escasez de suministro de la vacuna conjugada 7-valente neumocócica de Wyeth ilustra cómo de difícil es de producir y almacenar una vacuna que requiere tecnología sintética de vacunas conjugadas compleja.

En realizaciones deseables, las vacunas de la divulgación son vacunas de matriz capsular polivalentes (PCMV) donde uno o más componentes capsulares bacterianos están atrapados en una matriz de proteína transportadora polivalente. Las PCMV pueden producirse fácilmente debido a que se necesita como material de partida el antígeno de interés, por ejemplo, cápsulas, que solo son moderadamente puras. Por ejemplo, el ácido poli-gamma-D-glutámico (PGA) Vedan no es puro (llevó un activo de proteasa en DNI), sin embargo, como se describe en el presente documento, respondió exactamente como era de esperar para un antígeno independiente de linfocitos T

(Ejemplo 1). La incorporación de PGA en una PCMV fue satisfactoria en las tres preparaciones de PCMV que variaron en sus relaciones proteína con respecto a PGA durante un intervalo de 7 veces.

Debido a que el método de preparación de vacunas de la invención no requiere ningún conocimiento de la química del antígeno de interés, por ejemplo, el polisacárido de cápsula, el método no depende de la necesidad de desarrollar química de reticulación que sea compatible con la química del antígeno de interés y la proteína transportadora. Aunque es posible que algunos antígenos puedan, sin embargo, interactuar con el conector, esto no debe restarle valor a la eficacia de la vacuna, debido a que cabría esperar que la reticulación accidental del antígeno de interés y la proteína transportadora tuviera de todas formas propiedades inmunogénicas. En las vacunas de la invención, la reticulación del antígeno de interés con la proteína transportadora no es un requisito para que la vacuna sea eficaz. Esto contrasta fuertemente con vacunas conjugadas convencionales, que son así obstaculizadas en su fabricación y desarrollo. Las vacunas de la invención tienen deseablemente al menos, por ejemplo, el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, o incluso el 100 % de las proteínas transportadoras reticuladas y no más de, por ejemplo, el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o el 90 % del antígeno de interés está reticulado con la proteína transportadora. Deseablemente, no más del 10 % de los antígenos están reticulados con las proteínas transportadoras y al menos el 50 % de las proteínas transportadoras están reticuladas.

Los métodos de preparación de las vacunas descritas en el presente documento no producen la amplia modificación del antígeno de interés, por ejemplo, un polímero capsular. El antígeno generalmente sigue en el mismo estado con una posible modificación que es, por ejemplo, la reducción de azúcares reductores para cápsulas de PS que llevan tales grupos en el extremo de las cadenas de polímero. Es poco probable que tales modificaciones menores afecten la inmunogenicidad de la mayor parte del PS capsular debido a que los azúcares terminales son 100-1000X menos abundantes que los restos internos en el polímero. A diferencia, para vacunas conjugadas convencionales, es normalmente necesario introducir grupos conectores en el antígeno, por ejemplo, un polímero capsular, que sirve de punto de unión covalente de la proteína transportadora. Necesitan usarse conectores debido a que muchos antígenos, por ejemplo, polímeros capsulares, no tienen un grupo reactivo tal como un grupo carboxilo o amino como parte de su estructura. Por ejemplo, la introducción de química de conector en un PS puede producir la destrucción de epítopes capsulares y la generación de epítopes novedosos que podría no ser deseables en un producto de vacuna debido a su reactividad cruzada inmunológica desconocida con auto-epítopes del hospedador.

Los métodos de preparación de vacunas descritos en el presente documento son menos complejos que la tecnología de vacunas conjugadas debido a que su química depende de la química de reticulación de la proteína transportadora (por ejemplo, DNI, subunidad B de la toxina del cólera, toxina diftérica, fragmento C de la toxina tetánica, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*). Por ejemplo, aunque el polímero capsular afecta la tasa de reticulación cuando se mezcla con DNI, no afecta el patrón o grado de reticulación que está más gobernado por la proteína que se usa, su concentración y la concentración del agente de reticulación (por ejemplo, glutaraldehído) añadido. Estos parámetros pueden ser fácilmente ajustados, reduciendo así el tiempo y el esfuerzo requerido para preparar la vacuna, y ahorrando gastos.

Los métodos de preparación de vacunas de PCMV descritos en el presente documento pueden usarse con cualquier antígeno, por ejemplo, cualquier polímero capsular o cualquier polímero con algunos grupos amino, si hay alguno, y cualquier proteína transportadora que pueda ser reticulada, por ejemplo, proteínas transportadoras que no tienen epítopes críticos que puedan ser destruidos por reducción con borohidruro. Proteínas transportadoras que pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento tienen deseablemente al menos 2 restos de lisina u otros restos que no están bloqueados y que pueden ser reticulados por modificación química. El toxoide tetánico es una posible proteína transportadora. Esta toxina se desintoxica mediante tratamiento con formaldehído, un reactivo que reacciona con los grupos amino de proteínas. Otras proteínas transportadoras deseables incluyen la subunidad B de la toxina del cólera (disponible de SBL Vaccin AB), toxina diftérica, fragmento C de la toxina tetánica (disponible de Sigma Aldrich), DNI, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli* (disponible de Sigma Aldrich).

Las actuales vacunas conjugadas multivalentes se preparan por síntesis de vacunas conjugadas individuales primero, seguido de su mezcla para producir un vacuna conjugada "cóctel" (por ejemplo, la vacuna neumocócica heptavalente de Wyeth, Prevnar®). Los métodos de preparación de vacunas de la presente invención pueden usarse para preparar vacunas multivalentes mezclando antígenos químicamente diferentes, por ejemplo, polímeros orgánicos capsulares, juntos antes de la reticulación de la proteína transportadora, por ejemplo, con glutaraldehído, o mezclando vacunas específicas de la invención que se sintetizaron por separado. Esta flexibilidad proporciona ventajas significativas con respecto a los presentes métodos de fabricación de vacunas multivalentes.

Las vacunas a modo de ejemplo de la invención tratadas en los ejemplos, vacunas N.º 1-3 de PCMV, respondieron como la vacuna conjugada a pesar del hecho de que estas vacunas se sintetizaron por un método que no se predice que genere ningún enlace covalente entre átomos que constituyen la molécula de PGA y proteína DNI. El glutaraldehído reacciona exclusivamente con cadenas laterales de amino de proteínas tipificadas por el grupo amino épsilon de restos de lisina. El polímero de PGA no contiene grupos amino libres y posee solo cadenas laterales de carboxilo que no reaccionan con glutaraldehído. Así, las respuestas inmunitarias de tipo conjugado generadas por PCMV indican que las moléculas de PGA largas estuvieron molecularmente atrapadas dentro de una matriz reticulada de moléculas de proteínas DNI.

Según un modelo no limitante, el atrapamiento actúa para llevar proteína DNI y PGA en linfocitos B que se unen a tales matrices en virtud de receptores de Ig que reconocen PGA inmunológicamente. Una vez absorbidos dentro de estos linfocitos B, las matrices son degradadas de un modo similar a las vacunas conjugadas convencionales y que esto produce péptidos derivados de DNI que son presentados sobre moléculas de MHC-II de los linfocitos B correspondientes. Esto recluta a su vez la ayuda de linfocitos T y así conduce a la expansión y maduración de tales linfocitos B para llegar a ser plasma productor de IgG y células de memoria específicas para PGA. Así, según el modelo no limitante, las PCMV funcionan como vacunas capsulares de conjugado de proteína inmunológicamente, pero son distintas debido a que las PCMV carecen de enlace covalente significativo entre la proteína transportadora y los polímeros capsulares.

Las vacunas obtenidas por el método reivindicado, que incluyen PCMV, pueden usarse en combinación, por ejemplo, en vacunas pediátricas. Además, dichas vacunas pueden usarse para vacunar contra, por ejemplo, infección por neumococos, infección por estreptococos (grupos A y B), infección por *Haemophilus influenzae* tipo B ("HiB"), infección meningocócica (por ejemplo, *Neisseria meningitidis*), y pueden usarse como vacunas de antígeno O de bacterias Gram-negativas (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* (Thirumalapura et al., J. Med. Microbiol. 54:693-695, 2005; Vinogradov y Perry, Carbohydr. Res. 339:1643-1648, 2004; Vinogradov et al., Carbohydr. Res. 214:289-297, 1991), especie de *Shigella*, especie de *Salmonella*, especies de *Acinetobacter*, especie de *Burkholderia* y *Escherichia coli*).

Dichas vacunas pueden prepararse usando los conectores como se reivindica, tales como, por ejemplo, aquellos descritos en el presente documento, para reticular cualquier proteína transportadora, tal como, por ejemplo, aquellas descritas en el presente documento, en presencia de uno o más antígenos de interés, tales como, por ejemplo, aquellos descritos en el presente documento. Si se usa un antígeno de interés, la vacuna de matriz de proteína de la invención se dice que es monovalente. Si se usa más de un antígeno de interés, la vacuna de matriz de proteína de la invención se dice que es multivalente. Si un polímero capsular microbiano es el antígeno de interés, la vacuna de matriz de proteína de la invención se dice que es una vacuna de matriz capsular de proteína (PCMV).

25 Conectores

La reticulación de proteínas transportadoras es muy conocida en la técnica e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

Métodos generales y restos para reticular directamente proteínas transportadoras, usando conectores homobifuncionales o heterobifuncionales, se describen, por ejemplo, por G. T. Hermanson en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996 y Dick y Beurret en *Conjugate Vaccines*. Contribu. Microbiol. Immunol., Karger, Basal 10:48-114, 1989. Por ejemplo, con una proteína transportadora que poseen el número n de restos de lisina, hay, teóricamente, n+1 aminas primarias (incluyendo la amina terminal) disponibles para la reacción con un grupo carboxílico de reticulante a modo de ejemplo. Así, usando este procedimiento de conjugación directa el producto está limitado a tener n+1 enlaces amida formados.

El conector puede ser un esqueleto molecular lineal, cíclico o ramificado, con grupos laterales que se unen covalentemente a dos proteínas transportadoras, (A) y (B). Cualquier proteína transportadora dada puede unirse a más de una proteína transportadora, de forma que se cree una matriz de proteínas transportadoras interconectadas, en la que puede estar encerrada un antígeno.

El término grupo de enlace se refiere al enlace covalente que resulta de la combinación de restos reactivos del conector (L) con grupos funcionales de (A) o (B). Ejemplos de grupos de enlace incluyen, sin limitación, éster, carbamato, tioéster, imina, disulfuro, amida, éter, tioéter, sulfonamida, isourea, isotiourea, imidoéster, amidina, fosforamido, fosfodiéster, tioéter e hidrazona.

El enlace de (A) con (B) se logra por medios covalentes, que implican la formación de enlaces (grupo de enlace) con uno o más grupos funcionales localizados en (A) y (B). Ejemplos de grupos funcionales químicamente reactivos que pueden emplearse para este fin incluyen, sin limitación, grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo, carbonilo, tioéteres, guanidinilo, imidazolilo y fenólicos, todos los cuales están presentes en aminoácidos que existen de forma natural en muchas proteínas transportadoras.

El enlace covalente de (A) con (B) puede, por tanto, efectuarse usando un conector (L) que contiene restos reactivos capaces de reaccionar con tales grupos funcionales presentes en (A) y (B). El producto de esta reacción es un grupo de enlace que contiene los enlaces recién formados que unen (L) con (A) y (L) con (B). Por ejemplo, un grupo hidroxilo de (A) puede reaccionar con un grupo ácido carboxílico de (L), o un derivado activado del mismo, véase más adelante, que produce la formación de un grupo de enlace de éster.

Ejemplos de restos capaces de reacción con grupos sulfhidrilo incluyen compuestos de α -haloacetilo del tipo XCH_2CO- (donde X=Br, Cl o I), que muestran reactividad particular por grupos sulfhidrilo, pero que también pueden usarse para modificar grupos imidazolilo, tioéter, fenol y amino como se describe por, por ejemplo, Gurd, *Methods Enzymol.* 11:532, 1967. Los derivados de N-Maleimida también se consideran selectivos hacia grupos sulfhidrilo, pero además pueden ser útiles en el acoplamiento a grupos amino bajo ciertas condiciones. Pueden considerarse reactivos tales como 2-iminotiolano (Traut et al., *Biochemistry* 12:3266, 1973), que introduce un grupo tiol mediante

conversión de un grupo amino, como reactivos de sulfhidrilo si el enlace se produce mediante la formación de puentes disulfuro.

Ejemplos de restos reactivos capaces de reaccionar con grupos amino incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes y acilantes. Agentes alquilantes representativos incluyen:

- 5 (i) compuestos de α -haloacetilo, que muestran especificidad hacia grupos amino en ausencia de grupos tiol reactivos y son del tipo XCH_2CO- (donde $X=Cl, Br$ o I) como se describe por, por ejemplo, Wong (Biochemistry 24:5337, 1979);
- (ii) derivados de N-maleimida, que pueden reaccionar con grupos amino ya sea mediante una reacción de tipo de Michael o mediante acilación mediante la adición al grupo carbonilo del anillo como se describe por, por ejemplo, Smyth et al. (J. Am. Chem. Soc. 82:4600, 1960 y Biochem. J. 91:589, 1964);
- 10 (iii) haluros de arilo tales como compuestos nitrohaloaromáticos reactivos;
- (iv) haluros de alquilo, como se describe por, por ejemplo, McKenzie et al. (J. Protein Chem. 7:581, 1988);
- (v) aldehídos y cetonas capaces de formación de bases de Schiff con grupos amino, siendo los aductos formados normalmente estabilizados mediante la reducción para dar una amina estable;
- 15 (vi) derivados de epóxido tales como epiclohidrina y bisoxiranos, que pueden reaccionar con grupos amino, sulfhidrilo o hidroxilo fenólicos;
- (vii) derivados que contienen cloro de s-triazinas, que son muy reactivos hacia nucleófilos tales como grupos amino, sulfhidrilo e hidroxilo;
- (viii) aziridinas basadas en compuestos de s-triazina detallados anteriormente como se describe por, por ejemplo, Ross (J. Adv. Cancer Res. 2:1, 1954), que reaccionan con nucleófilos tales como grupos amino por apertura de anillo;
- 20 (ix) ésteres dietílicos de ácido escuárico como se describen por, por ejemplo, Tietze (Chem. Ber. 124:1215, 1991); y
- (x) α -haloalquil éteres, que son agentes alquilantes más reactivos que los haluros de alquilo normales debido a la activación producida por el átomo de oxígeno del éter, como se describe por, por ejemplo, Benneche et al. (Eur. J. Med. Chem. 28:463, 1993).
- 25

Agentes acilantes amino-reactivos representativos incluyen:

- (i) isocianatos e isotiocianatos, particularmente derivados aromáticos, que forman derivados de urea y tiourea estables, respectivamente;
- 30 (ii) cloruros de sulfonilo, que se han descrito por, por ejemplo, Herzig et al. (Biopolymers 2:349, 1964);
- (iii) haluros de ácido;
- (iv) ésteres activos tales como nitrofenilésteres o ésteres de N-hidroxisuccinimidilo;
- (v) anhídridos de ácido tales como N-carboxianhídridos simétricos mixtos, o;
- 35 (vi) otros reactivos útiles para la formación de enlaces amida como se describe por, por ejemplo, M. Bodansky (Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1984);
- (vii) acilazidas, por ejemplo, donde el grupo azida se genera a partir de un derivado de hidrazida preformado usando nitrito de sodio, como se describe por, por ejemplo, Wetz et al. (Anal. Biochem. 58:347, 1974); y
- 40 (viii) imidoésteres, que forman amidinas estables en la reacción con grupos amino como se describe por, por ejemplo, Hunter y Ludwig (J. Am. Chem. Soc. 84:3491, 1962).

Pueden hacerse reaccionar aldehídos, tales como, por ejemplo, glutaraldehído, y cetonas con aminas para formar bases de Schiff, que pueden estabilizarse ventajosamente mediante aminación reductora. Los restos alcoxilamino reaccionan fácilmente con cetonas y aldehídos para producir alcoxaminas estables como se describe por, por ejemplo, Webb et al. (Bioconjugate Chem. 1:96, 1990).

- 45 Ejemplos de restos reactivos capaces de reaccionar con grupos carboxilo incluyen compuestos diazoicos tales como ésteres de diazoacetato y diazoacetamidas, que reaccionan con alta especificidad para generar grupos éster como se describe por, por ejemplo, Herriot (Adv. Protein Chem. 3:169, 1947). También pueden emplearse restos de

modificación de ácidos carboxílicos, tales como carbodiimidias, que reaccionan mediante la formación de O-acilurea, seguido de la formación de enlace amida.

Los grupos funcionales en (A) y/o (B) pueden convertirse, si se desea, en otros grupos funcionales antes de la reacción, por ejemplo, para conferir reactividad o selectividad adicional. Ejemplos de métodos útiles para este fin incluyen conversión de aminas en ácidos carboxílicos usando reactivos tales como anhídridos dicarboxílicos; conversión de aminas en tioles usando reactivos tales como tiolactona de N-acetilhomocisteína, anhídrido S-acetilmercaptosuccínico, 2-iminotiolano, o derivados de succinimidilo que contienen tiol; conversión de tioles en ácidos carboxílicos usando reactivos tales como α -haloacetatos; conversión de tioles en aminas usando reactivos tales como etilenimina o 2-bromoetilamina; conversión de ácidos carboxílicos en aminas usando reactivos tales como carbodiimidias, seguido de diaminas; y conversión de alcoholes en tioles usando reactivos tales como cloruro de tosilo seguido de transesterificación con tioacetato e hidrólisis en el tiol con acetato sódico.

Pueden usarse, si se desea, los llamados conectores de longitud cero, que implican la unión covalente directa de un grupo químico reactivo de (A) con un grupo químico reactivo de (B) sin introducir material de enlace adicional según la invención. Ejemplos incluyen compuestos en los que (L) representa un enlace químico que une un átomo de oxígeno de (A) con un resto carbonilo o tiocarbonilo presente en (B), de forma que el grupo de enlace sea un éster o tioéster. Por ejemplo, puede unirse un grupo amino (A) a un grupo carboxilo (B) usando química de carbodiimida dando A-L-B donde L es un enlace amida o R-C=O unido a N-R donde R es la cadena de carbono derivada de cadenas laterales de aminoácido de las mismas moléculas de proteínas o dos diferentes.

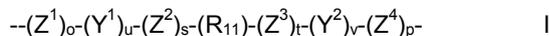
Lo más comúnmente, sin embargo, el conector incluye dos o más restos reactivos, como se ha descrito anteriormente, conectados por un elemento espaciador. La presencia de un espaciador permite que los conectores bifuncionales reaccionen con grupos funcionales específicos dentro de (A) y (B), produciendo un enlace covalente entre estos dos compuestos. Los restos reactivos en un conector (L) pueden ser iguales (conector homobifuncional) o diferentes (conector heterobifuncional, o, donde varios restos reactivos distintos están presentes, conector heteromultifuncional), proporcionando una diversidad de posibles reactivos que pueden provocar la unión covalente entre (A) y (B).

Los elementos de espaciador normalmente consisten en cadenas que separan eficazmente (A) y (B) por un alquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, o $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, en la que n es 1 a 4.

La naturaleza del material extrínseco introducido por el agente de enlace puede tener un comportamiento sobre la farmacocinética y/o actividad del producto de vacuna definitivo. Así, puede desearse introducir conectores escindibles, que contienen brazos de espaciador que son biodegradables o químicamente sensibles o que incorporan sitios de escisión enzimática.

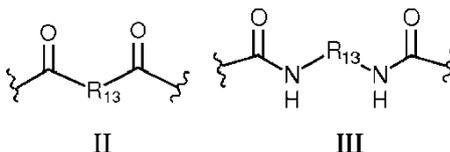
Estos conectores escindibles, como se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 92/17436, son fácilmente biodegradados *in vivo*. En algunos casos, se escinden grupos de enlace en presencia de esterasas, pero son estables en ausencia de tales enzimas. (A) y (B) pueden, por tanto, unirse ventajosamente para permitir su lenta liberación por enzimas activas cerca del sitio de enfermedad.

Los conectores pueden formar grupos de enlace con grupos diéster, diamida o dicarbamato biodegradables de fórmula I:



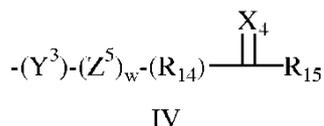
donde cada uno de Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 está seleccionado independientemente de O, S y NR_{12} (donde R_{12} es hidrógeno o un grupo alquilo); cada uno de Y^1 y Y^2 está seleccionado independientemente de un carbonilo, tiocarbonilo, sulfonilo, fosforilo o grupo formador de ácido similar; o, p, s, t, u, y v son cada uno independientemente 0 o 1; y R_{11} es un alquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, $-(CH_2CH_2O)_qCH_2CH_2-$ en la que q es 1 a 4, o un enlace químico que une $-(Z^1)_o-(Y^1)_u-(Z^2)_s-$ a $-(Z^3)_t-(Y^2)_v-(Z^4)_p-$.

Conectores (L) deseables a modo de ejemplo usados en la presente invención pueden describirse por cualquier de las fórmulas II-III:



donde el conector está covalentemente unido a tanto un átomo de oxígeno (A) como a un átomo de oxígeno de (B). Por consiguiente, el conector (L) de fórmulas II-III está unido a proteínas transportadoras (A) y (B) mediante grupos de enlace dipirano, éster o carbamato. En estas realizaciones, R₁₃ representa un alquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂- en la que n es 1 a 4, o un enlace químico que une dos nitrógenos o dos carbonilos.

Conectores diseñados para formar enlaces hidrazona tienen la fórmula química IV:



donde Z⁵ está seleccionado de O, S o NR₁₆; R₁₆ es hidrógeno o un grupo alquilo; R₁₅ está seleccionado de hidrógeno, un alquilo o un heteroalquilo; Y³ está seleccionado de un carbonilo, tiocarbonilo, sulfonilo, fosforilo, o un grupo formador de ácido similar covalentemente unido a átomo de oxígeno de (A); w es 0 o 1; R₁₄ es un alquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂-, en el que n es 1 a 4, o un enlace químico que une -(Y³)-(Z⁵)_w- a



y X₄ es una hidrazona resultante de la reacción de condensación de (B) que contiene un grupo hidrazida y el precursor con el conector II, en la que X₄ es el átomo de oxígeno de un grupo cetona o aldehído.

20 Proteínas transportadoras

En general, cualquier proteína transportadora que pueda ser atrapada con un antígeno como se reivindica en las condiciones fisiológicas puede ser usada en la presente invención. Deseablemente, el antígeno es atrapado en un complejo con proteínas transportadoras en ausencia de enlace covalente significativo entre el antígeno y una proteína transportadora. Ausencia de enlace covalente significativo se refiere a que no más del 50 % del antígeno está covalentemente unido a una proteína transportadora. En realizaciones deseables, no más del 40 %, 30 %, 10 %, o el 5 % del antígeno está covalentemente unido a una proteína transportadora. El complejo de antígeno/proteína transportadora puede contener otro compuesto, tal como alumbre, y este otro compuesto, en realizaciones deseables, puede atrapar el antígeno y la proteína transportadora.

Proteínas transportadoras usadas en las vacunas de la invención son deseablemente proteínas que, tanto solas como en combinación con un antígeno, provocan una respuesta inmunitaria en un sujeto. Deseablemente, la proteína transportadora contiene al menos un epítipo reconocido por un linfocito T. Deseablemente, el epítipo es capaz de inducir una respuesta de linfocitos T en un sujeto, e inducir linfocitos B para producir anticuerpos contra todo el antígeno de interés. Epítipos, como se usa en la descripción de la presente invención, incluyen cualquier determinante sobre un antígeno que es responsable de su interacción específica con una molécula de anticuerpo o fragmento de la misma. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas, además de características de carga específicas. Para tener propiedades inmunogénicas, una proteína o polipéptido generalmente es capaz de estimular linfocitos T. Sin embargo, una proteína transportadora que carece de un epítipo reconocido por un linfocito T también puede ser inmunogénica.

Seleccionando una proteína transportadora que es conocida por provocar una fuerte respuesta inmunogénica, puede tratarse una diversa población de sujetos por una PCMV descrita en el presente documento. La proteína transportadora es deseablemente suficientemente extraña para provocar una fuerte respuesta inmunitaria a la vacuna. Normalmente, la proteína transportadora usada es una molécula que es capaz de conferir inmunogenicidad al antígeno de interés. En una realización deseable, una proteína transportadora es una que es inherentemente altamente inmunogénica. Así, se desea una proteína transportadora que tenga un alto grado de inmunogenicidad y sea capaz de maximizar la producción de anticuerpos para los antígenos complejados con ella.

Diversas proteínas transportadoras de la invención incluyen, por ejemplo, toxinas y toxoides (químicos o genéticos), que pueden o pueden no ser mutantes, tales como toxina del carbunco, PA y DNI (PharmAthene, Inc.), toxoide diftérico (Massachusetts State Biological Labs; Serum Institute of India, Ltd.) o CRM 197, toxina tetánica, toxoide tetánico (Massachusetts State Biological Labs; Serum Institute of India, Ltd.), fragmento Z de la toxina tetánica, exotoxina A o mutantes de exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, flagelina bacteriana, neumolisina, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (cepa disponible de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo,

Manassas, VA)), proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli*, toxina de tipo Shiga, proteína LTB humana, un extracto de proteína de células bacterianas completas, y cualquier otra proteína que pueda ser reticulada por un conector. Deseablemente, la proteína transportadora es la subunidad B de la toxina del cólera (disponible de SBL Vaccin AB), toxina diftérica (Connaught, Inc.), fragmento C de la toxina tetánica (disponible de Sigma Aldrich), DNI, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli* (disponible de Sigma Aldrich). Otras proteínas transportadoras deseables incluyen albúmina de suero bovino (BSA), P40 y riboflavina de pollo. (A menos que se indique lo contrario, las proteínas transportadoras a modo de ejemplo están comercialmente disponibles de Sigma Aldrich.) Otras proteínas transportadoras a modo de ejemplo son MAP (péptidos multi-antigénicos), que son péptidos ramificados. Usando un MAP, se maximiza la densidad de reticulación debido a múltiples restos de aminoácidos ramificados. Un aminoácido a modo de ejemplo que puede usarse para formar un MAP es, pero no se limita a, lisina.

Tanto BSA como la hemocianina de lapa californiana (KLH) han sido comúnmente usadas como transportadores en el desarrollo de vacunas cuando se experimenta con animales. Proteínas transportadoras que se han usado en la preparación de vacunas terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, varias toxinas de bacterias patógenas y sus toxoides. Ejemplos incluyen toxinas diftéricas y tetánicas y sus toxoides correspondientes médicamente aceptables. Otros candidatos son proteínas antigénicamente similares a toxinas bacterianas denominados materiales de reacción cruzada (CRM). Las proteínas transportadoras de la invención también pueden incluir cualquier proteína no derivada de seres humanos y no presente en ninguna sustancia alimenticia humana.

En realizaciones deseables de la invención, se usan proteínas que forman estructuras de tipo anillo para la producción de PCMV. Tales proteínas incluyen la proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, las "subunidades B" no tóxicas de la toxina del cólera, la enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* y toxina de tipo Shiga. Tales complejos de proteína de tipo anillo pueden formar "perlas en un hilo" donde las cadenas de PS lineal penetran en el canal central de estos complejos de proteína en forma de anillo. Después de la reticulación de proteínas, se predice que tales complejos son particularmente estables. Datos estructurales de las proteínas sugieren que estos canales centrales son lo suficientemente grandes para que las cadenas de PS entren fácilmente. Por ejemplo, el canal central del anillo hexamérico de Hcp1 tiene 42 Angstroms que es lo suficientemente ancho para acomodar fácilmente varias cadenas de polisacárido de 5,5 Angstroms de ancho (Mougous et al., Science 312(5779):1526-1530, 2006). Alternativamente, los anillos de proteína pueden ensamblarse alrededor del PS (por ejemplo, de subunidades de una proteína transportadora monomérica que se ensambla naturalmente en anillos bajo condiciones fisicoquímicas particulares). Tales proteínas monoméricas que pueden ensamblarse en anillos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, neumolisina (Walker et al., Infect. Immun. 55(5):1184-1189, 1987; Kanclerski y Mollby, J. Clin. Microbiol. 25(2):222-225, 1987), listeriolisina O (Kayal y Charbit, FEMS Microbiol. Rev. 30:514-529, 2006; Mengaud et al., Infect. Immun. 55(12):3225-3227, 1987), DNI, PA de carbunco, Hcp1, subunidad B de la toxina del cólera, subunidad B de la toxina de Shiga, flagelina, y numerosas moléculas relacionadas conocidas en la técnica y producidas por diversos microorganismos.

En otra realización deseable, se usan agonistas del receptor del tipo toll (TLR) como proteínas transportadoras. La activación del receptor del tipo toll (TLR) es importante en moldear la respuesta inmunitaria adaptativa y puede desempeñar una función en la maduración por afinidad de la respuesta de anticuerpos, cambio de isotipo y memoria inmunológica. La flagelina (FLA) de *Vibrio cholerae* es un agonista de TLR. Se han purificado más de 20 mg de proteína FLA de *Escherichia coli* recombinante y se mostró que era un potente activador de TLR en el ensayo de inducción de macrófagos por IL-6 descrito en el presente documento. Además, también se ha mostrado que una proteína bien conservada de *Streptococcus pneumoniae* llamada "Neumolisina" activa TLR4 y, además, es un antígeno protector. Así, esta proteína también puede usarse como proteína transportadora de PCMV.

Además, se usan mezclas de proteína de la membrana externa (OMP) (por ejemplo, las OMP de *Neisseria meningitidis*) como proteína transportadora para la vacuna conjugada de HIB producida por Merck y se ha mostrado que extractos de proteína de células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* completas son al menos parcialmente protectores en el modelo de infección de animal. En realizaciones deseables de la invención, estas mezclas de proteína son la fuente de proteína transportadora de PCMV.

En una realización deseable, se usa el método de PCMV con una proteína transportadora que tiene, por ejemplo, al menos 2 restos de lisina u otros restos que no están bloqueados y que pueden ser reticulados por modificación química. En otras realizaciones deseables, la proteína transportadora es un multímero (por ejemplo, uno que contiene al menos 5 subunidades). Deseablemente, el multímero es un homomultímero.

En otra realización, se usa DNI como la proteína transportadora debido a que es no tóxica no sin necesidad de desintoxicar la proteína antes de uso. Además, se desea el uso de DNI debido a que DNI también puede inducir una respuesta inmunitaria protectora a *B. anthracis*, además de la respuesta inmunitaria protectora al antígeno de interés. Por tanto, DNI no tiene enlaces disulfuro internos. Tales enlaces son susceptibles a la formación de borohidruro, que podría desnaturalizar la proteína y producir la pérdida de epítopes que inducen al anticuerpo neutralizante de la toxina del carbunco.

Antígenos de interés

Las composiciones de vacuna obtenidas por el método de la invención y los métodos de preparación y administración de tales vacunas pueden usarse para cualquier antígeno de interés como se reivindica. Deseablemente, el antígeno de interés no lleva grupos primarios que puedan ser destruidos por las reacciones químicas empleadas por el método de preparación de vacunas, por ejemplo, la desnaturalización de un antígeno producido por la destrucción de enlaces disulfuro de antígeno por reducción de borohidruro. Antígenos de interés a modo de ejemplo incluyen polímeros orgánicos tales como polisacáridos (por ejemplo, polisacáridos que tienen al menos 18 restos), fosfopolisacáridos, polisacáridos con aminoazúcares con sustituciones de N-acetilo, polisacáridos que contienen azúcares sulfanilados, otros azúcares modificados con sulfato, o azúcares modificados con fosfato, polialcoholes, poliaminoácidos, ácidos teicoicos, cadenas laterales O de lipopolisacáridos. Antígenos de interés a modo de ejemplo también incluyen polímeros orgánicos capsulares que incluyen aquellos sintetizados por microbios, por ejemplo, bacterias, hongos, parásitos y virus, y entonces purificados de una fuente biológica usando métodos convencionales. Antígenos de interés a modo de ejemplo incluyen polímeros orgánicos capsulares microbianos que incluyen aquellos purificados de organismos bacterianos tales como especies de *Bacillus* (que incluyen *B. anthracis*) (Wang y Lucas, *Infect. Immun.* 72(9):5460-5463, 2004), *Streptococcus pneumoniae* (Bentley et al., *PLoS Genet.* 2(3):e31, Epub 2006; Kolkman et al., *J. Biochemistry* 123:937-945, 1998; y Kong et al., *J. Med. Microbiol.* 54:351-356, 2005), *Shigella* (Zhao et al., *Carbohydr. Res.* 342(9): 1275-1279, Epub 2007), *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* (Zhao et al., *Carbohydr. Res.* 342(9): 1275-1279, Epub 2007) y *Pseudomonas aeruginosa*, y organismos fúngicos tales como *Cryptococcus* y *Candida*, además de muchos otros microorganismos (véanse, por ejemplo, Ovodov, *Biochemistry (Mosc.)* 71(9):937-954, 2006; Lee et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 491:453-471, 2001; y Lee, *Mol. Immunol.* 24(10):1005-1019, 1987). Antígenos de interés a modo de ejemplo también incluyen polímeros que no se producen en la naturaleza y así no son de origen biológico.

Composiciones de vacuna

Las vacunas obtenidas por el método de la invención, que incluyen PCMV, pueden usarse en combinación, por ejemplo, en vacunas pediátricas. Además, dichas vacunas pueden usarse para vacunar contra, por ejemplo, infección por neumococos, infección por *Haemophilus influenzae* tipo B ("HiB"), infección por estreptococos (grupos A y B), infección meningocócica (por ejemplo, *Neisseria meningitidis*), y pueden usarse como vacunas de antígeno O de bacterias Gram-negativas (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, especie de *Shigella*, especie de *Salmonella*, especies de *Acinetobacter*, especie de *Burkholderia* y *Escherichia coli*).

La formulación de vacuna incluye deseablemente al menos una proteína transportadora, uno o más antígenos de interés, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, fosfato de aluminio, cloruro sódico y agua estéril). Una composición de vacuna también puede incluir un sistema de adyuvante para potenciar la inmunogenicidad de la formulación, tal como aceite en un sistema de agua y otros sistemas conocidos en la técnica u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Se desea que un complejo de transportador/antígeno que es insoluble en condiciones fisiológicas libere lentamente el antígeno después de la administración a un sujeto. Un complejo tal se administra deseablemente en una suspensión que contiene excipientes farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, el complejo de transportador/antígeno también puede ser soluble en condiciones fisiológicas.

Normalmente, la vacuna está en un volumen de aproximadamente 0,5 ml para inyección subcutánea, 0,1 ml para inyección intradérmica, o 0,002-0,02 ml para administración percutánea. Una dosis de 0,5 ml de la vacuna puede contener aproximadamente 2-500 µg del antígeno atrapado con aproximadamente 2-500 µg de la proteína transportadora. En una realización deseable, en una dosis de 0,5 ml, aproximadamente 10 µg del antígeno son atrapados con aproximadamente 10 µg de la proteína transportadora. La relación molar de antígeno con respecto a proteína transportadora está deseablemente entre 1 y 10 (por ejemplo, 1 parte de antígeno con respecto a 2 partes de transportador o 1 parte de antígeno con respecto a 3 partes de transportador) y 10 a 1 (por ejemplo, 3 partes de antígeno con respecto a una parte de transportador o 2 partes de antígeno con respecto a 1 parte de transportador). En una realización deseable, la relación molar de antígeno con respecto a transportador es 1 a 1. Alternativamente, la relación en peso seco de antígeno con respecto a proteína transportadora está deseablemente entre 1 a 10 y 10 a 1 (por ejemplo, 1 a 1 en peso seco).

Debido a que los péptidos o conjugados pueden ser degradados en el estómago, la vacuna se administra deseablemente por vía parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Aunque se desea la administración por un medio que penetre físicamente en la capa dérmica (por ejemplo, una aguja, pistola de aire, o abrasión), las vacunas de la invención también pueden administrarse por absorción transdérmica.

En particular, dichas vacunas pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, inyección intradérmica o inmunización transcutánea con adyuvantes inmunitarios apropiados. Dichas vacunas pueden administrarse, una o más veces, que incluye frecuentemente una segunda administración diseñada para reforzar la producción de anticuerpos en un sujeto para prevenir la infección por un agente infeccioso. La frecuencia

y cantidad de dosis de vacuna depende de la actividad específica de la vacuna y puede determinarse fácilmente por experimentación rutinaria.

5 Por ejemplo, para un lactante, un programa de vacunas puede ser tres dosis de 0,5 ml de cada una a intervalos de aproximadamente cuatro a ocho semanas (empezando a la edad de dos meses), seguido de una cuarta dosis de 0,5 ml a la edad de aproximadamente doce a quince meses. Una quinta dosis entre cuatro y seis años de edad puede ser deseable para algunas vacunas.

10 Aunque la edad a la que se administra la primera dosis generalmente es dos meses, puede administrarse una vacuna a lactantes tan jóvenes como de 6 semanas de edad. Para niños que son mayores que la edad de un programa de vacunación de lactantes rutinario, las vacunas de la invención pueden administrarse según el siguiente programa a modo de ejemplo.

Edad de la primera dosis	Programa de dosificación
7-11 meses de edad	Total de tres dosis de 0,5 ml; las dos primeras separadas al menos cuatro semanas y la tercera al menos dos meses después de la segunda dosis
12-23 meses de edad	Total de dos dosis de 0,5 ml separadas al menos dos meses
24 meses a 9 años de de edad	Una dosis de 0,5 ml

Para adultos, dos o más dosis de 0,5 ml a intervalos de 2-8 semanas generalmente son suficientes para proporcionar la protección a largo plazo. Deseablemente se administra una dosis de refuerzo cada diez años a adultos previamente inmunizados y a niños de más de once años de edad.

15 Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de uso. Las vacunas obtenidas por el método de la invención pueden formularse en vehículos farmacológicamente aceptables, por ejemplo, gel de hidróxido de alumbre, preparación de adyuvante, o solución salina, y entonces administrarse, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, inyección intradérmica o inmunización transcutánea, con adyuvantes inmunitarios apropiados. La divulgación también incluye kits que incluyen una vacuna descrita en el presente documento (por ejemplo, una PCMV). Estos kits también pueden incluir instrucciones para usar los kits en los métodos de vacunación descritos en el presente documento.

25 La eficacia del programa de inmunización puede determinarse usando métodos convencionales para medir el título de anticuerpos en el sujeto. En general, títulos medios de anticuerpos (deseablemente títulos de IgG) de aproximadamente 1 µg/ml se consideran indicativos de protección a largo plazo. Los complejos de antígeno/proteína transportadora para su uso en las composiciones de vacuna en el presente documento se describen deseablemente entre 10 nm y 100 µm de diámetro. Los virus pueden tener 100 nm de diámetro y son inmunogénicos. Las bacterias completas tienen 1-10 µm de diámetro y también son inmunogénicas. Una agrupación pequeña de bacterias puede tener aproximadamente 100 µm de diámetro. En realizaciones particulares, un complejo de antígeno/proteína transportadora en una composición de vacuna tiene deseablemente entre 100 nm y 10 µm de diámetro. Este complejo puede ser soluble o insoluble.

35 La invención se describe en el presente documento a continuación por referencia a ejemplos específicos, realizaciones y figuras, cuyo fin es ilustrar la invención en vez de limitar su alcance. Los siguientes ejemplos no deben interpretarse como limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparaciones de vacuna y de control.

40 Se compró ácido poli-gamma-D-glutámico (PGA) capsular de Vedan (Taiwán) o se purificó por el método de Rhie et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10925-10930, 2003). El mutante negativo dominante (DNI) es una forma mutada de antígeno protector (PA) de *B. anthracis* y se produjo de *Escherichia coli* por el método de Benson, et al. (Biochemistry 37:3941-3948, 1998). PGA y la proteína DNI se dializaron exhaustivamente contra tampón fosfato de sodio 0,05 M a pH 7,4 (SP7,4) antes de uso. La disolución madre de DNI contuvo 30 mg/ml. La disolución madre de PGA contuvo 134 mg/ml. El conector glutaraldehído se compró de Pierce como una disolución madre al 25 %. Las vacunas de matriz capsular de proteína (PCMV) y los controles se ensamblaron en reacciones según la Tabla 1.

45

Tabla 1. Ensamblaje de reacciones para la producción de las preparaciones de PCMV 1-3 y controles 4 y 5

Reacción N.º	DNI	PGA	dH2O	25 % de glutaraldehído	
	ml	ml	ml	ml	Nombre
1	20	1	3	0,8	PCMV1
2	12	4	8	0,8	PCMV2
3	16	2	6	0,8	PCMV3
4	16	2	6	0	P+C control
5	16	0	8	0,8	P solo control

5 Las cinco reacciones se ensamblaron a temperatura ambiente (22 °C) sin glutaraldehído. A T=0, se añadió 0,1 ml de 25 % de glutaraldehído (G25) a las reacciones indicadas. Cada 30 segundos a partir de aquí se añadieron otros 0,1 ml de G25 y esto se repitió hasta que cada reacción indicada había recibido 0,8 ml de G25 en total. La reticulación de moléculas de DNI por las moléculas de glutaraldehído bifuncional pudo observarse macroscópicamente por la generación de grados variables de turbidez y partículas de tipo "gel" insolubles en el siguiente orden: la mayor turbidez y formación de gel, reacciones 1>2>3>4, quedando la reacción 5 totalmente clara y soluble. Después de 1 hora, se añadieron 2 ml de borohidruro de sodio 1 M en tampón borato de sodio 0,5 M a pH 9,3 (SBH) a las seis reacciones para reducir las bases de Schiff formadas entre las cadenas laterales de amino de las moléculas de DNI y las moléculas de glutaraldehído bifuncional. Se añadió antiespumante de silicona (0,01 ml) a cada reacción para controlar la espumación durante esta reacción. Las reacciones se almacenaron a 4 °C durante 72 horas. Todas las reacciones se dializaron entonces exhaustivamente contra SP7,4, durante 48 horas. El material insoluble se eliminó por centrifugación de los productos finales y se guardó a 4 °C hasta uso.

15 Se sintetizó un conjugado convencional entre albúmina de suero bovino (BSA) y PGA acoplado los grupos amino de BSA a los grupos carboxilo de PGA usando la carbodiimida soluble en agua, EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), del siguiente modo: se mezclaron 5 ml de 30 mg/ml de BSA en agua con 1 ml de 134 mg/ml de PGA en NP7,5. Se añadieron 50 mg de EDAC y se dejó que la reacción avanzara a TA durante 3 horas. La reacción se dializó a 4 °C durante 18 horas contra SP7,4 que contenía glicina 1 mM para bloquear los grupos activos y luego a 4 °C durante 24 horas contra SP7,4 solo. El producto final se denomina conjugado de PGA-BSA.

25 Después de la síntesis y diálisis de preparaciones de PCMV y de control, se examinó el estado molecular de la proteína DNI para confirmar que el glutaraldehído había de hecho reticulado molecularmente la proteína en presencia o ausencia de diversas cantidades de PGA. Se monitorizaron las preparaciones de PCMV y de control para tal reticulación por electroforesis en gel de SDS (dodecilsulfato de sodio)-poliacrilamida y transferencia Western con antisuero anti-PA. Como se muestra en la Figura 2, la proteína DNI migra a 84 kDa antes de la reticulación con glutaraldehído. PCVM1-PCMV3 (carriles 1-3) muestran amplia reticulación de la proteína DNI como se demuestra por la migración de bandas a masas moleculares mayores de 220 kDa. La proteína DNI sola reticulada en ausencia de PGA también muestra las mismas especies de alto peso molecular (carril 5). A diferencia, DNI mezclada con PGA pero no tratada con glutaraldehído muestra bandas que co-migran con DNI o especies de peso molecular más bajo (carril 4). Así, la preparación de PGA de Vedan (Taiwán) pareció estar contaminada con una proteasa activa contra DNI. Muestras de PGA de Vedan realizadas en el carril 6, sin embargo, no mostraron altos niveles de proteínas contaminantes que reaccionaran con el anticuerpo anti-PA, sugiriendo que las bandas observadas fueron productos derivados de DNI de las diversas reacciones.

35 Además, PGA y uno o más de los PS neumocócicos como antígenos se usan para explorar si FLA (flagelina de *Vibrio cholerae*) es una mejor proteína transportadora que DNI en el contexto de PCMV. El efecto de la proteína transportadora se evalúa midiendo el nivel de IgG dirigida contra PGA, y los PS logrados por la inmunización con estas diversas PCMV, además de su potencia basándose en el peso de proteína.

40 Las PCMV también pueden prepararse mediante un procedimiento que reticule grupos amino a grupos carboxi directamente sin el uso de un reticulante bifuncional. En particular, pueden prepararse PCMV por reticulación de grupos amino y carboxilo de las proteínas transportadoras usando química de carbodiimida. Esta química forma enlaces peptídicos entre grupos amino primarios de cadenas laterales de lisina y los grupos carboxilo de cadenas laterales de aspartato y glutamato. Aunque los grupos amino están principalmente bloqueados en toxoides tratados con formalina, la formalina no reacciona con grupos carboxilo en absoluto. Así, la química de carbodiimida puede ser útil en la preparación de PCMV usando toxoides de formalina que pueden resistir a la reticulación del glutaraldehído. La reticulación es fácilmente detectada por SDS-PAGE. La presencia de "manchas" de proteína de alto peso molecular que dependen de la adición de un reticulante como glutaraldehído es indicativa de reticulación.

Tabla 2. Reticulación de proteínas transportadoras determinada por análisis de SDS-PAGE.

Glutaraldehído	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Polímero capsular	-PGA	-PGA	+PGA	+PS 6B	+PS 23F
BSA	-	+	+	+	+
Toxina diftérica	-	+	+	n.d.	n.d.
Toxoide diftérico	-	-	-	n.d.	n.d.
Toxoide tetánico	-	+	+	n.d.	n.d.
signos + indican que la reticulación se detectó por SDS-PAGE, signos - indican que la migración de proteína no estuvo alterada de la observada en el control no de glutaraldehído. n.d. – no determinado (ensayo no realizado).					

Para los experimentos mostrados en la Tabla 2, se hicieron reacciones de 200 microlitros en HEPES 50 mM a pH 7,5 y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las reacciones se inactivaron con borohidruro de sodio 120 mM. Se añadió glutaraldehído a 64 mM, se usó albúmina de suero bovino (BSA) a 15 mg/ml, se usaron toxina diftérica, toxoide diftérico y toxoide tetánico a aproximadamente 5 mg/ml, se añadió PGA a 13,4 mg/ml, se añadieron PS de neumococo tipo 6B y 23F a 4 mg/ml.

Como se muestra en la Tabla 2, algunas proteínas tratadas con formalina (por ejemplo, toxoide diftérico) no se reticulan bien con glutaraldehído y, por tanto, requieren otra química de reticulación para su uso en la preparación de PCMV. Otras, como el toxoide tetánico, pueden ser reticuladas con glutaraldehído pero no al mismo grado que las proteínas no modificadas tales como toxina diftérica y albúmina de suero bovino.

Ejemplo 2. Inmunización y análisis de respuestas inmunitarias anti-DNI y anti-PGA.

Los productos solubles de las 5 reacciones descritas en la Tabla 1 se ajustaron a la misma concentración de proteína basándose en su absorbancia a 280 nm. Se usaron ratones de aproximadamente 5-7 semana de edad BALB/c de Charles River en todos los estudios de inmunización descritos en la Figura 2. Los ratones se inmunizaron con las vacunas de PCMV 1-3 y los controles de preparación de antígeno 4 y 5 a una dosis de 20 µg de proteína DNI mediante inyección intraperitoneal en el día 0. Todos los ratones se sangraron en el día 7 y luego se reforzaron con preparaciones de dosis de antígeno del mismo tamaño en el día 10. Los ratones se sangraron otra vez en el día 17 y luego se reforzaron otra vez en el día 20. Los ratones se sangraron otra vez en el día 30, momento en el que se sacrificaron. Se recogió suero de muestras de sangre después de que se produjera la coagulación y se guardaron a -20 °C. Se usó ensayo de inmunoadsorción (ELISA) para ensayar el nivel de anticuerpos del suero anti-PGA y anti-DNI. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación Immulon 2HB ELISA (VWR) con o bien BSA-PGA o bien DNI en tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,6, a 0,5 µg/pocillo en un volumen de 100 µl/pocillo. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, se bloquearon las placas recubiertas de antígeno por incubación con 3 % de BSA (peso/volumen) en TBS-0,1 % de Tween (TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Se diluyeron sucesivamente muestras de suero reunidas de grupos de cuatro ratones de cada momento de tiempo después del refuerzo en TBST y se añadieron a las placas recubiertas con anticuerpo y se incubaron durante al menos 1 hora. Se determinaron las respuestas de anticuerpos anti-DNI y anti-PGA usando antisuero de conejo contra IgG o IgM de ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Zymed). Se añadió el sustrato fosfato de p-nitrofenilo (PNPP) a cada pocillo y se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 405 nm para cada reacción. Los datos se informan como el recíproco del título del punto final, definido como la máxima dilución para obtener una lectura de DO₄₀₅ que estaba dos desviaciones estándar por encima de la del control negativo.

Se usaron ensayos de ELISA para medir las respuestas inmunitarias anti-DNI y anti-PGA específicas de IgM e IgG en ratones inmunizados con las tres preparaciones de PCMV 1-3 y las dos preparaciones de control de antígeno 4 y 5 (Figuras 3-5). Como se muestra en la Figura 3, la proteína DNI fue altamente inmunogénica en todas las preparaciones, excepto la preparación de control 4 que no se reticuló con glutaraldehído (Sin glut). Sin embargo, estas respuestas inmunitarias específicas de DNI estuvieron exclusivamente basadas en IgG. Aunque no se detectó IgM anti-DNI incluso en el día 7 de la inmunización, pudo detectarse una respuesta de IgG anti-DNI significativa en ratones inmunizados con preparaciones de PCMV en el día 17 y aquellos inmunizados con DNI reticulada solo (preparación 5). Se observó una fuerte respuesta de refuerzo contra DNI en el día 30 con todas las preparaciones que incluyen la preparación 4.

Respuestas de IgM anti-PGA mostraron un patrón que fue típico de un polímero capsular (Figura 4). La preparación de control 4 generó una respuesta de IgM anti-PGA detectable en el día 7, pero esta respuesta no se reforzó en el día 17 o día 30. Todas las preparaciones de PCMV indujeron una respuesta de IgM anti-PGA en el día 7 y luego generaron exclusivamente incluso respuestas de IgM anti-PGA más fuertes en los días 17 y 30. Como era de esperar, la preparación de control 5 (DNI reticulada solo) no generó ni una respuesta anti-PGA basada en IgM ni en

IgG. En claro contraste, PCMV1-3 (preparaciones 1-3) generaron fuertes respuestas anti-PGA basadas en IgG que fueron evidentes en el día 17 y luego se reforzaron claramente en el día 30 (Figura 5). Las respuestas anti-PGA basadas en IgG observadas para PCMV1-3 fueron claramente similares a las respuestas informadas a PGA observadas para una vacuna conjugada de PGA-DNI convencional como se informa por Aulinger et al. (Infect. Immun. 73:3408-3414, 2005) y a una vacuna conjugada de PA-PGA descrita por Rhie et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10925-10930, 2003). Así, las vacunas PCMV N.º 1, N.º 2 y N.º 3 rindieron tan bien como las vacunas de PGA de conjugado convencionales que indujeron respuestas de IgG a PGA capsular, un antígeno protector independiente de T conocido de *B. anthracis* (Wang et al., Infect. Immun. 72:5460-5463, 2004). La preparación de control 5 que contuvo DNI (no reticulada) mezclada con PGA no indujo IgG detectable contra PGA, que indica que DNI no actúa de un ligando de TLR en la estimulación de respuestas anti-PGA de IgG en preparaciones de PCMV 1-3. Este resultado también confirma las observaciones en la bibliografía de que PGA es un inmunogén independiente de linfocitos T de baja inmunogenicidad, a menos que se acople a proteína mediante enlaces covalentes (Rhie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10925-10930, 2003). El método de PCMV convierte aparentemente PGA en un inmunogén dependiente de linfocitos T, a pesar del hecho de que el método no produce reticulación de la proteína DNI directamente con moléculas de PGA.

Estos datos confirman que el método de PCMV puede producir inmunógenos con propiedades similares a la vacuna conjugada convencional. La PCMV de PGA se preparó fácilmente usando los métodos descritos en el presente documento y se encontró que inducía respuestas inmunitarias típicas de vacunas conjugadas de PGA-proteína. Las reacciones a pequeña escala detalladas en la Tabla 1 produjeron PCMV suficientes para inmunizar 1000 ratones basándose en el esquema de dosificación brevemente expuesto en la Figura 3. Los presentes datos confirman que la PCMV preparada a partir de PGA y DNI puede usarse como vacuna para proteger contra el carbunco producido por *Bacillus anthracis*.

Ejemplo 3. Generación y caracterización de PCMV adicionales.

Puede aplicarse la tecnología de PCMV a antígenos capsulares de diversas estructuras y cargas iónicas. Se compraron 23 tipos de PS de *Streptococcus pneumoniae* de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se fabrican por Merck, Inc. Estos PS varían ampliamente en su estructura molecular e incluyen PS que son fuertemente aniónicos, parcialmente catiónicos, de carga neutra, fosforilados, lineales, tienen estructuras ramificadas, y modificados de diversas otras formas. En experimentos preliminares, se ensayó un subconjunto de estos PS que se corresponde con los siete tipos capsulares en el producto de Wyeth Prevnar (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) para su capacidad para inducir la producción de IL-6 por macrófagos de ratón. El PS tipo 4 era activo en este ensayo; el lipopolisacárido (LPS) era el control para un agonista de TLR. También se ensayaron otros PS (por ejemplo, tipo 3), PGA, y PS de antígeno O de *F. tularensis*, además de una vacuna PCMV preparada a partir de PGA-DNI y un control no reticulado. Este experimento mostró que el PS de neumococo de tipo 3, y a un menor grado PGA, también estaba contaminado con un agonista de TLR. El PS de *F. tularensis* y la PCMV estuvieron comparablemente limpias en el ensayo. La extracción con fenol y precipitación en etanol podrían "limpiar" (eliminar agonistas de TLR desconocidos residuales) de PS tipo 3 de *S. pneumoniae* después de dos tratamientos consecutivos. Por consiguiente, se encontró que seis PS de *S. pneumoniae* y el PS de antígeno O de *F. tularensis* estaban limpios para la producción de IL6 y éstos han sido explorados en los experimentos descritos en el presente documento.

Se han sintetizado PCMV para los siete PS encontrados limpios para la producción de IL6 usando DNI como proteína transportadora por un método análogo al descrito en el Ejemplo 1. Ensayos de inmunogenicidad preliminares sugieren que las siete PCMV fueron inmunogénicas a grados variables. Se encontró que una PCMV "monovalente" basada en DNI para el PS 14 de *S. pneumoniae* (14-PCMV) inducía altos títulos de IgG anti-PPS14 que se reforzaron significativamente después de la tercera inmunización. Sorprendentemente, se observó la misma respuesta inmunitaria cuando 14-PCMV se mezcló con las otras seis PCMV para preparar un inmunogén "cóctel". Debido a que Prevnar® es una vacuna "adyuvantada" absorbida en alumbre, se determinó si el cóctel de PCMV hexavalente también podría absorberse al adyuvante de alumbre. Los resultados de un inmunoensayo que mide cualitativamente la cantidad de PS de *S. pneumoniae* absorbido al alumbre después de la exposición a PCMV o a una mezcla de control de los mismos PS mezclados con proteína DNI, pero no glutaraldehído reticulado, mostraron que se absorbió mucho más PS al alumbre en el contexto de una PCMV que el control (PS + proteína DNI no reticulada) (como se indica por el nivel más alto de inmunorreactividad para la PCMV que se diluye adicionalmente en el inmunoensayo).

Se usó inmunización de ratones para evaluar la inmunogenicidad de la PCMV heptavalente con o sin absorción a adyuvante de alumbre. El adyuvante de alumbre mejoró la cinética de la respuesta inmunitaria a PS14, induciendo IgG contra este PS 7 días antes que la vacuna no adyuvantada. Sin embargo, la PCMV heptavalente fue más inmunogénica en ausencia de alumbre que la combinación de PS+DNI no reticulada de control en presencia de alumbre. Este resultado confirma que el procedimiento de PCMV convierte los PS en más inmunogénicos para los ratones y soporta que el procedimiento de PCMV puede usarse para preparar cócteles de antígenos que rinden de forma inmunológicamente similar a los cócteles de vacunas conjugadas.

En experimentos adicionales, se usa extracción con fenol y precipitación en etanol para eliminar agonistas de TLR contaminantes de las 23 preparaciones comerciales de polisacárido de neumococo. La eliminación de los contaminantes se confirma probando los PS tratados para la inducción de IL-6 por macrófagos peritoneales por

métodos convencionales. Se usan PS que carecen de actividad de inducción de IL-6 para la producción de PCMV. Otros polisacáridos que se usan en PCMV incluyen un PS de antígeno O purificado de *F. tularensis* y cápsula de PGA de *B. anthracis*. Se examinan un total de 25 tipos capsulares (23 tipos neumocócicos, y cada uno de los tipos de tularemia y carbunco). Cada uno de los 25 tipos capsulares se usa para preparar una PCMV usando la proteína DNI, esencialmente por el método descrito en el Ejemplo 1. Se usa una relación uno a uno de PS con respecto a proteína (aproximadamente 1:1 en peso seco) para estas preparaciones de PCMV iniciales. Cada preparación se caracteriza por SDS-PAGE para evidencia de reticulación de proteína que se ha correlacionado perfectamente con la inmunogenicidad de diversas preparaciones de PCMV en experimentos preliminares. Para algunos tipos capsulares (por ejemplo, 6B y 23F), se usan otras proteínas transportadoras para preparar PCMV. Para estos mismos tipos capsulares (por ejemplo, 6B y 23F), puede usarse una química de reticulación alternativa. Todas las preparaciones de PCMV que muestran evidencia de reticulación de proteína (por ejemplo, en SDS-PAGE), se prueban para su inmunogenicidad.

Por ejemplo, se preparan diez PCMV diferentes usando cinco proteínas diferentes de la matriz y se preparan dos antígenos diferentes del siguiente modo. La selección de las cinco proteínas de la matriz se basa en su uso actual en las vacunas autorizadas por la FDA u otras propiedades que les permiten servir de trazadores para medir la estabilidad de preparaciones de PCMV. Se usan las siguiente proteínas de la matriz (1) subunidad B de la toxina del cólera (disponible de SBL Vaccin AB), (2) toxina diftérica, (3) fragmento C de la toxina tetánica, "Frag C" (disponible de Sigma Aldrich), (4) DNI, y (5) beta-galactosidasa de *Escherichia coli* (disponible de Sigma Aldrich). Como antígenos capsulares se usan ácido poli-D-glutámico de *Bacillus anthracis* y cápsula tipo 14 de *Streptococcus pneumoniae* (Suarez et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:969-971, 2001). Ambos de estos antígenos capsulares son altamente inmunogénicos cuando se usan con DNI como proteína de la matriz en PCMV correspondientes. Cada antígeno de cápsula se combina con cada una de las cinco proteínas de la matriz seleccionadas para producir 10 PCMV distintas.

Pueden probarse PCMV para su capacidad para inducir, en ratones, cambio de anticuerpo de isotipo a IgG como se observa en vacunas conjugadas convencionales. Todos los antígenos pueden absorberse a alumbre y entonces normalmente se usan grupos de 5 ratones por preparación de PCMV. Los ratones se sangran para obtener respuestas inmunitarias del nivel inicial a los antígenos de prueba. Los ratones se inmunizan entonces tres veces (en el día 0, 7, 14) por el protocolo de inyección IP estándar y se recoge sangre en los días 10, 20, 30 y 60 días después de la inmunización primaria. Se analizaron sueros de ratón por ensayo de ELISA estándar para IgG contra el PS y las proteínas transportadoras usadas. En estos experimentos, se incluyen grupos de control de ratones inmunizados con solo PS para evaluar la capacidad de diversas preparaciones de PCMV para inducir IgG anti-PS en comparación con el PS no conjugado que debe ser poco o no inmunogénico. PCMV prometedoras (es decir, PCMV que inducen altos niveles de IgG contra PS) se someten a análisis inmunológico más cuidadoso que busca establecer la cinética y aspectos de respuesta a dosis de la respuesta inmunitaria a las PCMV en ratones.

Alternativamente, PCMV prometedoras y sus controles correspondientes pueden ser enviados a vendedores comerciales para la producción de antisueros de conejo. Se realizan inmunoensayos similares para evaluar la inmunogenicidad, clase de anticuerpo inducido y cinética de respuesta inmunitaria en conejos. En estos experimentos, el control es el producto comercial Prevnar® que es una mezcla absorbida en alumbre de 7 vacunas de conjugado de PS convencionales diferentes acopladas a CRM 197, la proteína mutante no tóxica relacionada con toxina diftérica.

Pueden evaluarse la funcionalidad de las respuestas de anticuerpos inducidas con PCMV. Por ejemplo, la funcionalidad puede evaluarse midiendo la capacidad del anticuerpo anti-PS a opsonizar *S. pneumococcus* encapsulado y conducir a la destrucción bacteriana después de la fagocitosis por macrófagos. La protección de animales de la exposición letal a *S. pneumococcus* es otra forma de demostrar la eficacia de la vacuna en animales inmunizados con PCMV.

Ejemplo 4. Comparación de PCMV con Prevnar®

Se determinó la limpieza relativa de los polisacáridos de *S. pneumoniae* (pps) 6B, 14 y 23F obtenidos de ATCC mediante Merck o directamente del Serum Institute of India (SII). Se usó la expresión de IL-6 como un indicador de la limpieza en un pps y se usó LPS como control "sucio" positivo. Como se muestra en la Figura 9A, pps 6B, 14 y 23F de Merck están limpios, mientras que, como se muestra en la Figura 9B, pps 6B de SII está "sucio." Como se muestra en la Figura 10, el tratamiento 2 (una hora de incubación a 80 °C en NaOH 1 M) limpia pps 6B de SII. El pps 6B limpio se usa para la comparación de propiedades inmunológicas de conjugados y PCMV. Como se muestra en la Tabla 3, el contaminante no es LPS.

Tabla 3. Ensayo de los niveles de endotoxina de polisacáridos

Polisacáridos	Unidades de endotoxina /mg de polisacárido
pps 6B de SII - sin tratamiento	0,75
pps 23F de SII - sin tratamiento	0,85
pps 23F de SII - tratamiento 2	0,24
diversos pps de Merck - sin tratamiento	0,1 - 0,4

5 Las Figuras 11 y 13 muestran que Plevnar® (que está adyuvantada con alumbre) induce anticuerpos IgG contra los pps 6B y que la respuesta de IgG de PCMV adyuvantadas con alumbre (BSA y pps 6B; toxina diftérica y pps 6B; toxoide diftérico y pps 6B; y toxoide tetánico y pps 6B) es mejor que la observada con Plevnar®. Similarmente, como se muestra en la Figura 12, la respuesta de IgM a PCMV adyuvantadas con alumbre es similar a la observada para Plevnar®.

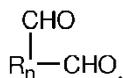
10 Además, para pps 14 (los pps más inmunogénicos en Plevnar®), como se muestra en las Figuras 14-16, PCMV adyuvantadas con alumbre que contienen toxoide diftérico y pps 14 o toxoide tetánico y pps 14, son aproximadamente equivalentes a Plevnar® en inducir una respuesta de IgG.

Ejemplo 5. PCMV multivalentes.

15 Se produjeron inmunógenos multivalentes usando el método de PCMV mezclando químicamente diferentes polímeros orgánicos capsulares juntos antes de la reticulación de la proteína transportadora DNI con glutaraldehído ("reacción sintética de una etapa"). Se prepararon inmunógenos trivalentes de éste a partir de tres polímeros orgánicos - PGA, alginato y dextrano - usando DNI como transportador. Estas vacunas trivalentes fueron inmunogénicas y generaron respuestas inmunitarias contra los tres polímeros orgánicos capsulares como se muestra por la IgG de suero reunida analizada pre-inmunización y después de 30 días (Figura 6), el título de anticuerpos IgG de suero específica de antígeno 60 días después de la inmunización (Figura 7) y el título de anticuerpos en suero anti-PS 128 días después de la inmunización (Figura 8). Como también se muestra en las Figuras 6-8, las preparaciones de PCMV de alginato monovalentes también generaron una respuesta inmunitaria en ratones. También pueden formularse inmunógenos de PCMV multivalentes mezclando PCMV específicas que se sintetizan por separado y luego se mezclan juntas al final para producir una vacuna "cóctel".

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una composición de vacuna que comprende un antígeno que es atrapado con la matriz de proteína transportadora y está no covalentemente asociado a dicha matriz de proteína que comprende (i) mezclar un antígeno de interés seleccionado del grupo que consiste en un polisacárido, un polialcohol, en el que el polialcohol es una forma hidrogenada de un hidrato de carbono donde un grupo carbonilo ha sido reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario, y un homopolímero de poliaminoácido con una proteína transportadora y (ii) añadir un conector que reticula dicha proteína transportadora mediante grupos sulfhidrilo, amino o carboxilo de las moléculas de proteína transportadora, y (iii) reticular dicha proteína transportadora para formar una matriz de proteína transportadora.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha composición de vacuna comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la relación molar de dicho antígeno con respecto a dicha proteína transportadora está entre 1 a 10 y 10 a 1 en dicha composición de vacuna.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína transportadora es un multímero, en particular en el que dicho multímero comprende al menos 5 subunidades, o en el que dicho multímero es un homomultímero.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende reducir una base de Schiff en dicha proteína transportadora.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína transportadora está covalentemente reticulada con al menos otra proteína transportadora, en particular en el que dicha reticulación covalente comprende un enlace peptídico entre un grupo amino primario de una cadena lateral de lisina y un grupo carboxi de una cadena lateral de aspartato o glutamato, o en el que dicho enlace covalente comprende un reticulante bifuncional, más en particular en el que dicho reticulante bifuncional es glutaraldehído, bis[sulfosuccinimidil]suberato, o adipimidato de dimetilo.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho conector es un compuesto de fórmula



- en la que R_n es un alquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos de carbono, un heteroalquilo lineal o ramificado de 1 a 12 átomos, un alqueno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un alquino lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ en la que q es 1 a 4, o en la que dicho conector es glutaraldehído, éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida, carbodiimida, o bencidina bis-biazotizada.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína transportadora es toxina diftérica o un mutante de la misma, toxoide diftérico, toxina tetánica o un mutante de la misma, toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante de la misma, subunidad B de la toxina del cólera, fragmento C de la toxina tetánica, flagelina bacteriana, neumolisina, listeriolisina O, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli*, toxina de tipo Shiga, proteína LTB humana, un extracto de proteína de células bacterianas completas, el mutante negativo dominante (DNI) del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*, en particular en el que dichas células bacterianas completas son células de *Pseudomonas aeruginosa* o estreptocócicas, o en el que dicha flagelina bacteriana es la proteína flagelina de *Vibrio cholerae*.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha toxina de tipo Shiga es la proteína StxB2 de *Shigella*.
10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polisacárido comprende al menos 18 restos, o en el que dicho polisacárido es un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*, polisacárido de *Francisella tularensis*, polisacárido de *Bacillus anthracis*, polisacárido de *Haemophilus influenzae*, polisacárido de *Salmonella typhi*, polisacáridos de especies de *Shigella*, polisacáridos de especies de *Salmonella*, o polisacárido de *Neisseria meningitidis*, incluso más en particular en el que dicho polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* es el tipo capsular 3, 4, 6B, 7A, 7B, 7C, 7F, 9A, 9L, 9N, 9V, 12A, 12B, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 17, 18B, 18C, 19F, 23F, 25A, 25F, 33F, 35, 37, 38, 44 o 46, o en el que dicho polisacárido de *Francisella tularensis* es el antígeno O.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el homopolímero de poliaminoácido es un polímero capsular microbiano, en particular en el que dicho polímero capsular microbiano es ácido poli-gamma-D-glutámico de *Bacillus anthracis*.
12. El método de la reivindicación 1, que comprende además un segundo antígeno de interés, en particular que comprende además un tercer antígeno de interés.

Figura 1

Antígenos de conjugado

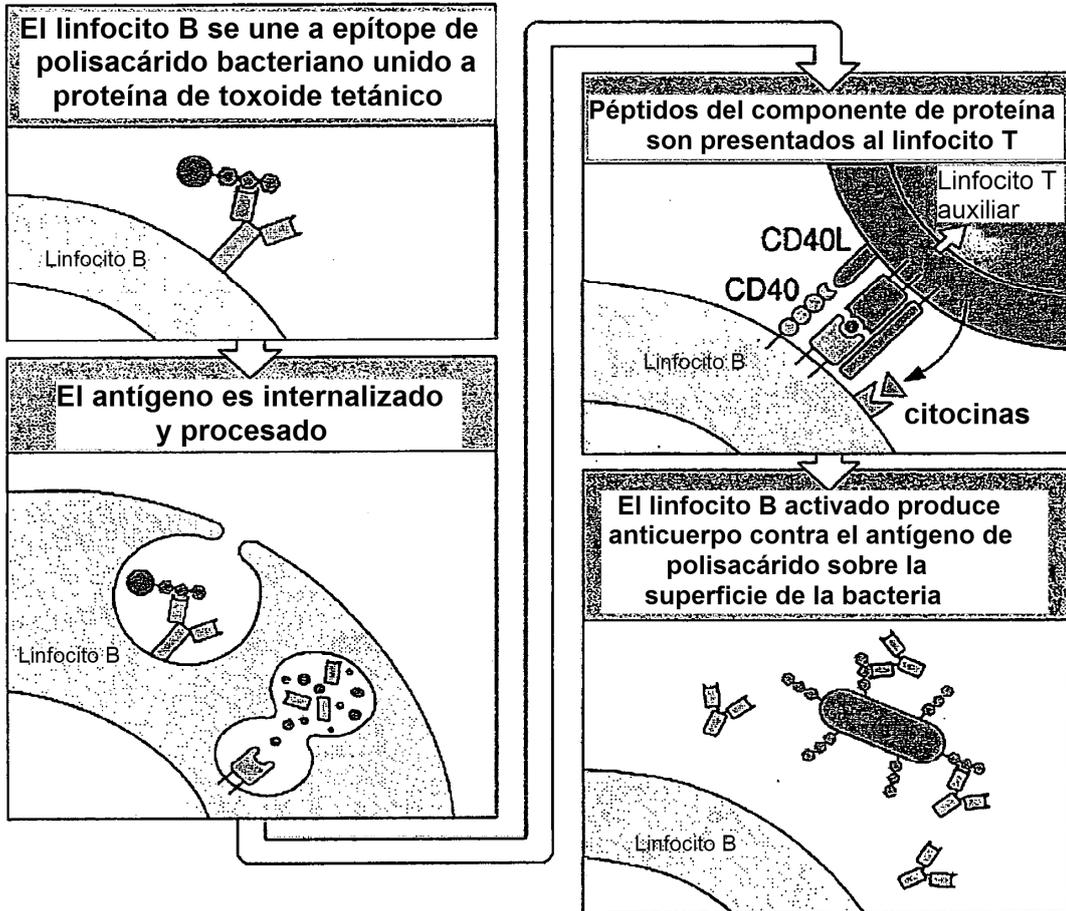
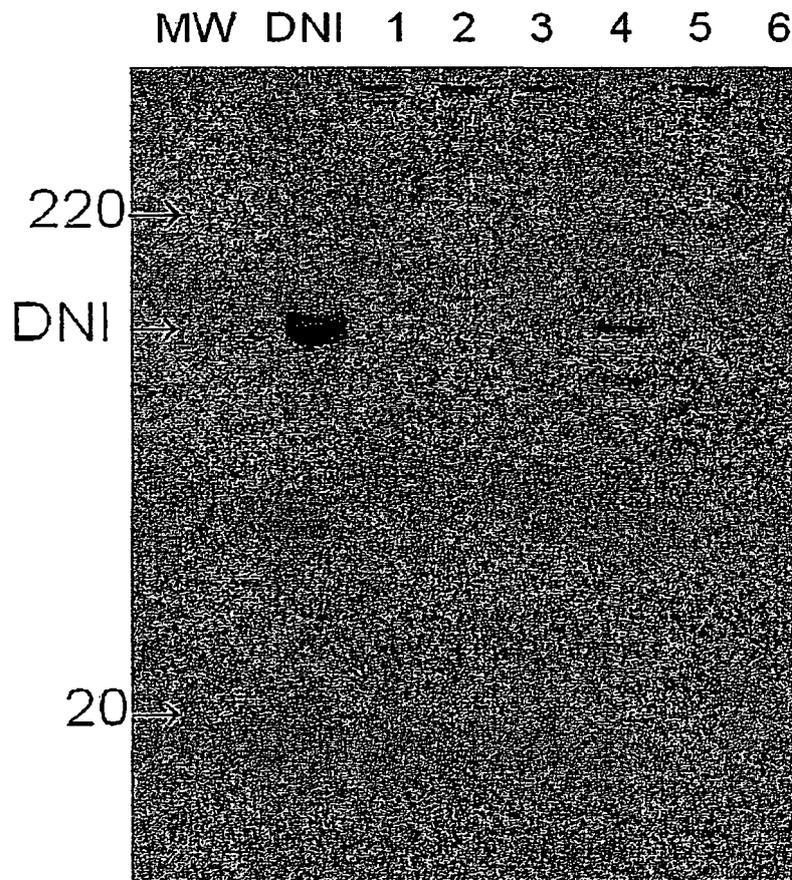


Fig 9.4 © 2001 Garland Science

Figura 2

Análisis de transferencia Western anti-PA de preparaciones de vacuna



Muestras

1. DNI+PGA (PCMV1)
2. DNI+PGA (PCMV2)
3. DNI+PGA (PCMV3)
4. DNI+PGA sin control de glutaraldehído
5. DNI solo con control de glutaraldehído
6. PGA

Figura 3

IgM e IgG de suero anti-DNI reunido

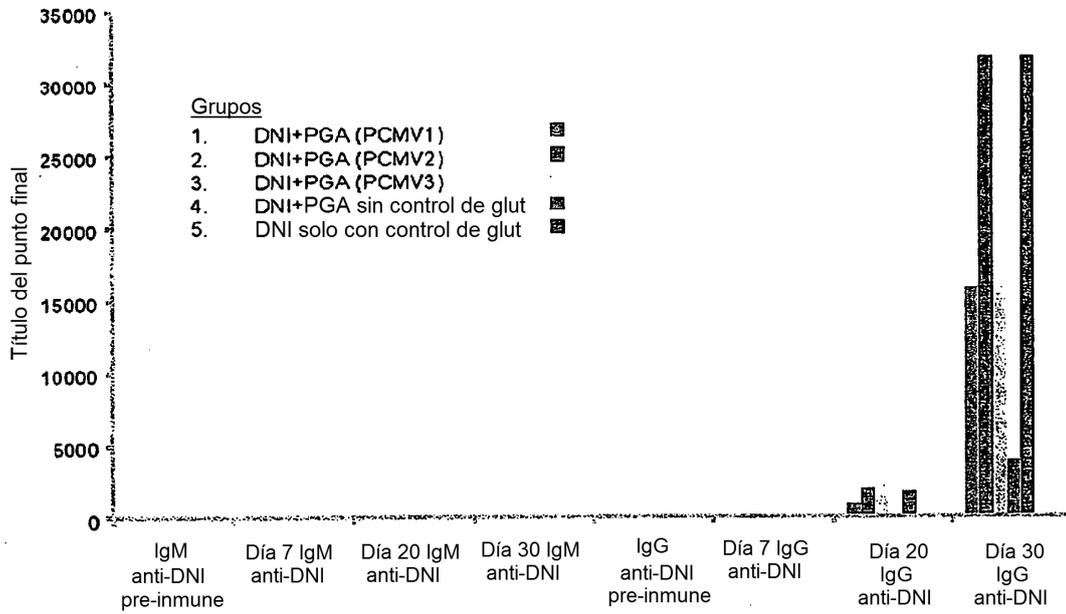


Figura 4

IgM de suero anti-PGA reunido

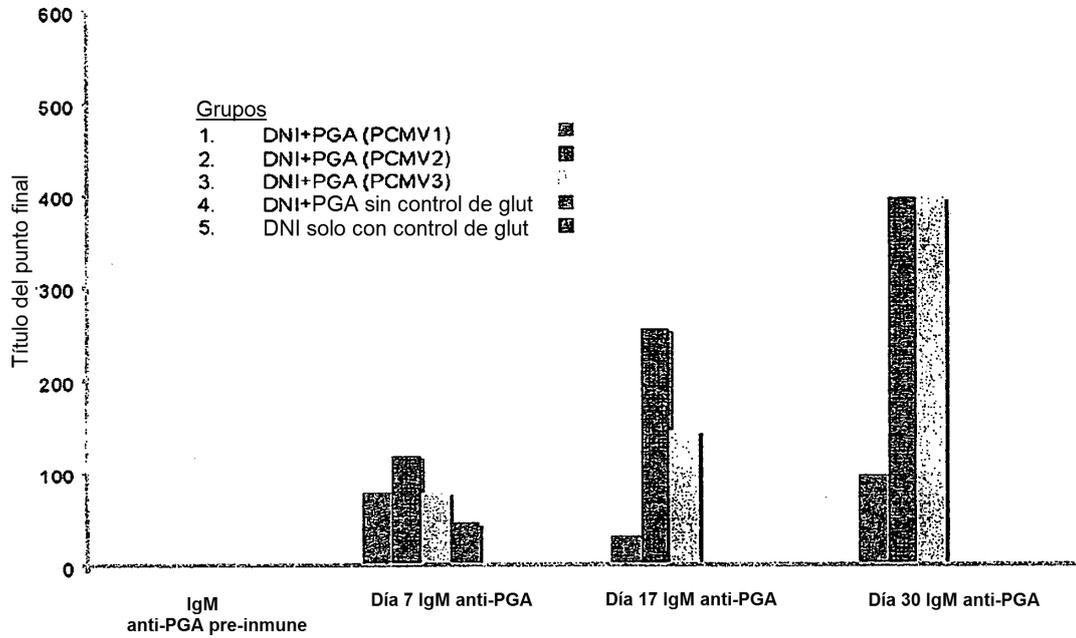
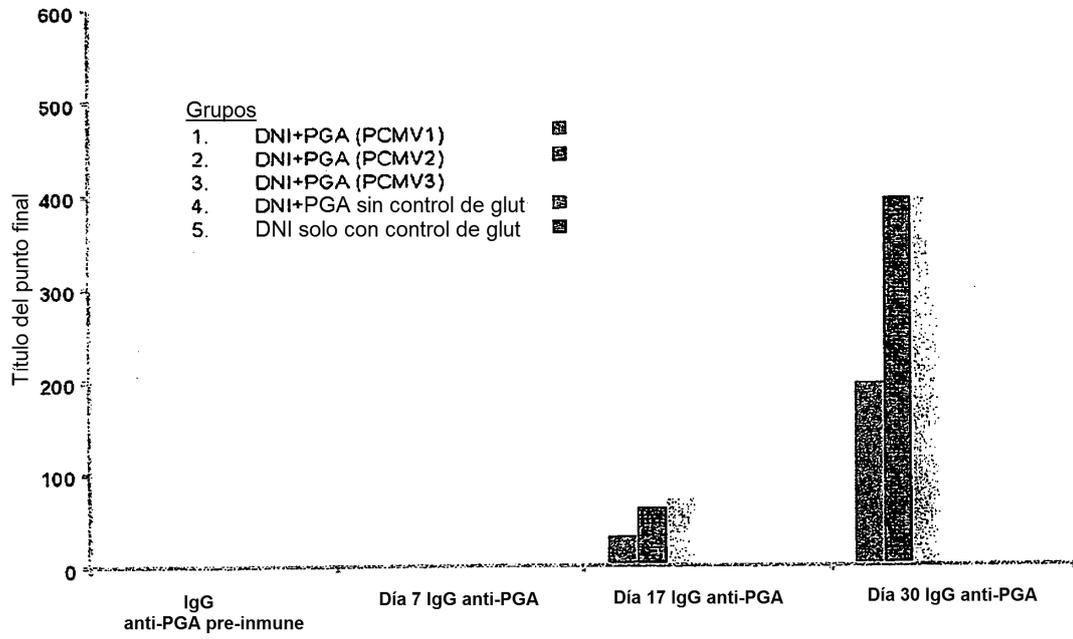


Figura 5

IgG de suero anti-PGA reunido



Respuestas inmunitarias a preparaciones de PCMV de alginato monovalentes y trivalentes (alginato, dextrano, PGA) "de una sola etapa"

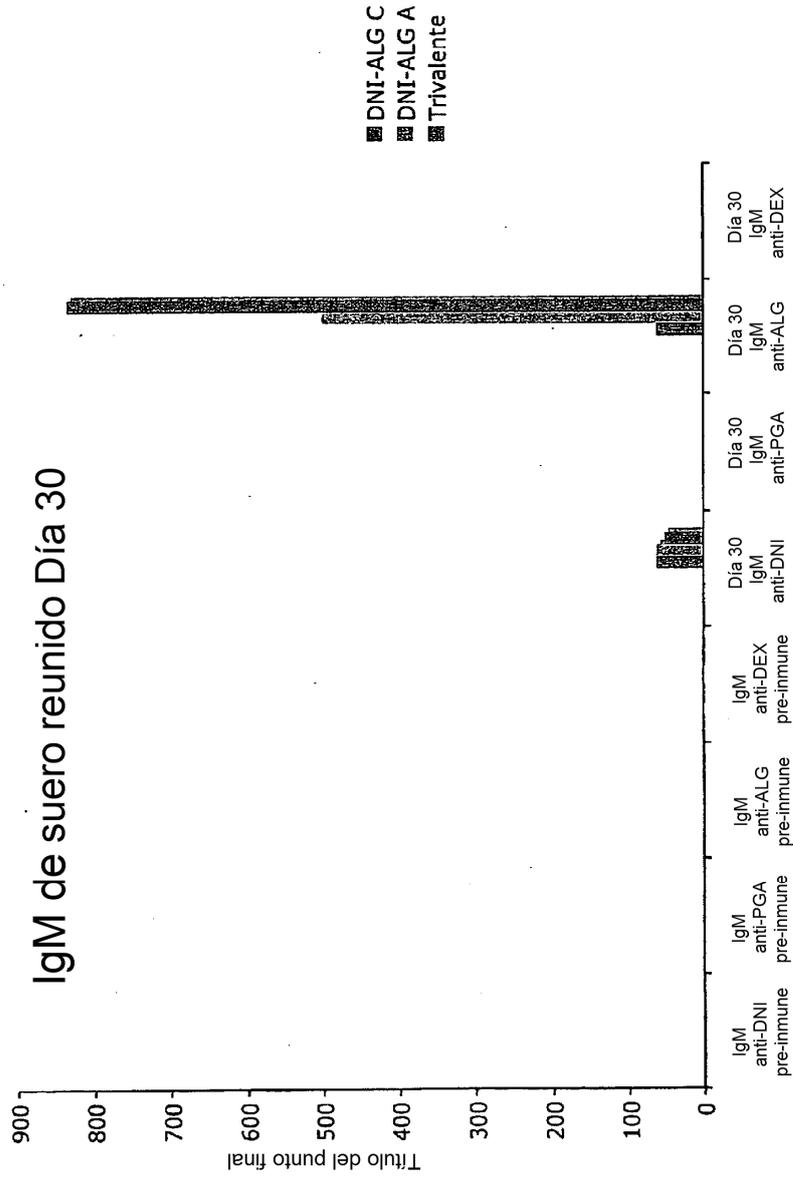


Figura 6

Respuestas inmunitarias a preparaciones de PCMV de alginato monovalentes y trivalentes (alginato, dextrano, PGA) "de una sola etapa"

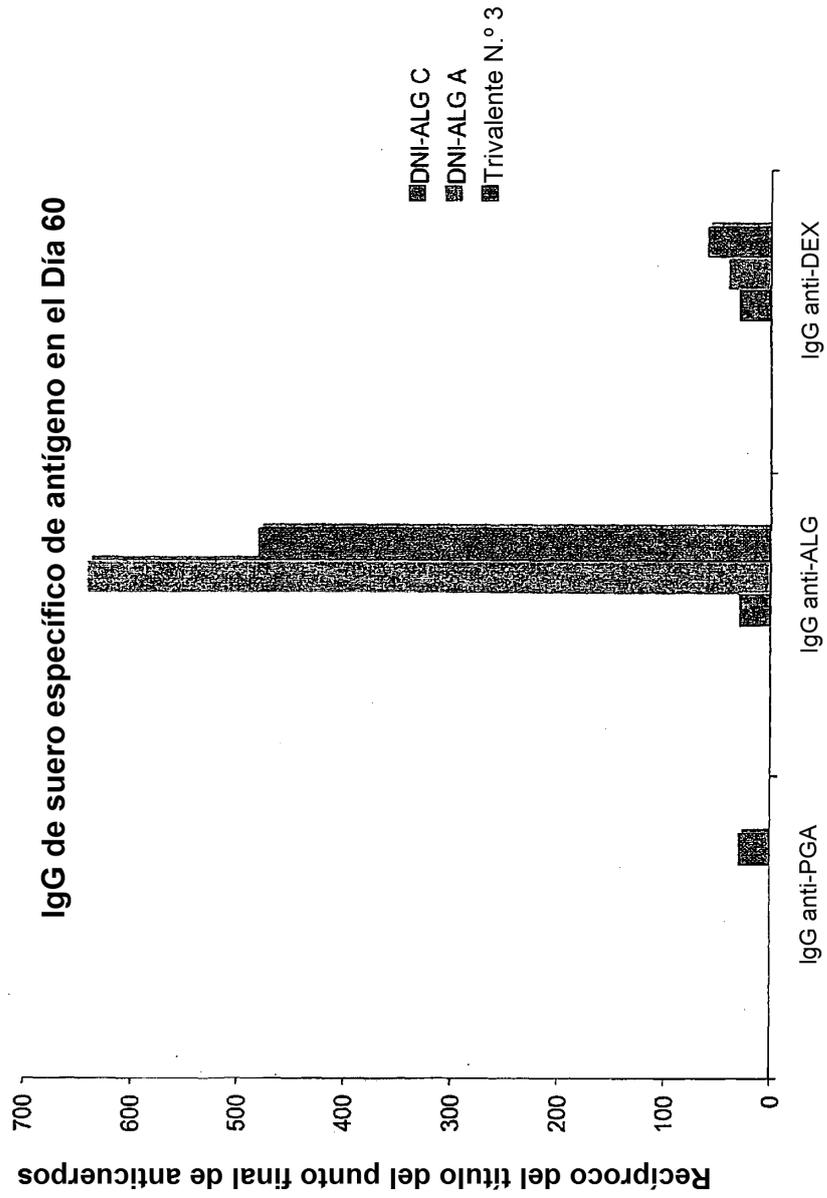


Figura 7

Respuestas inmunitarias a preparaciones de PCMV de alginato monovalentes y trivalentes (alginato, dextrano, PGA) "de una sola etapa"

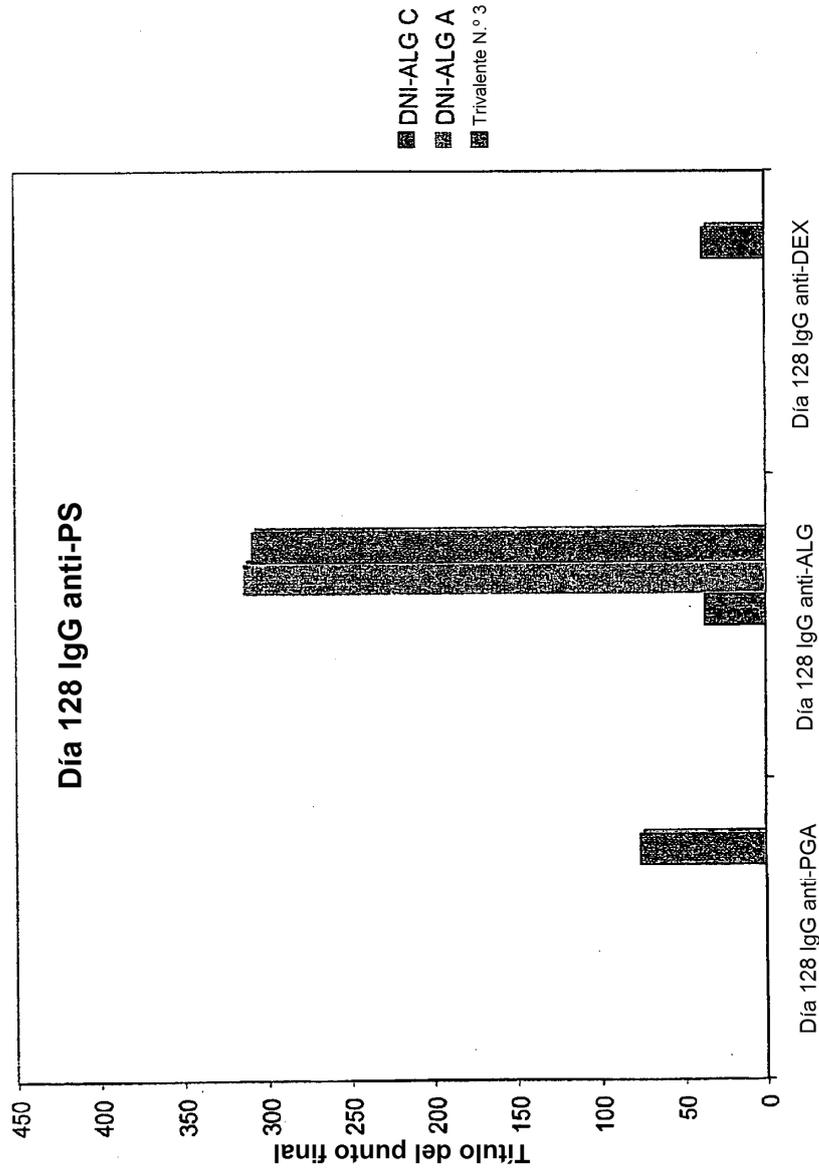


Figura 8

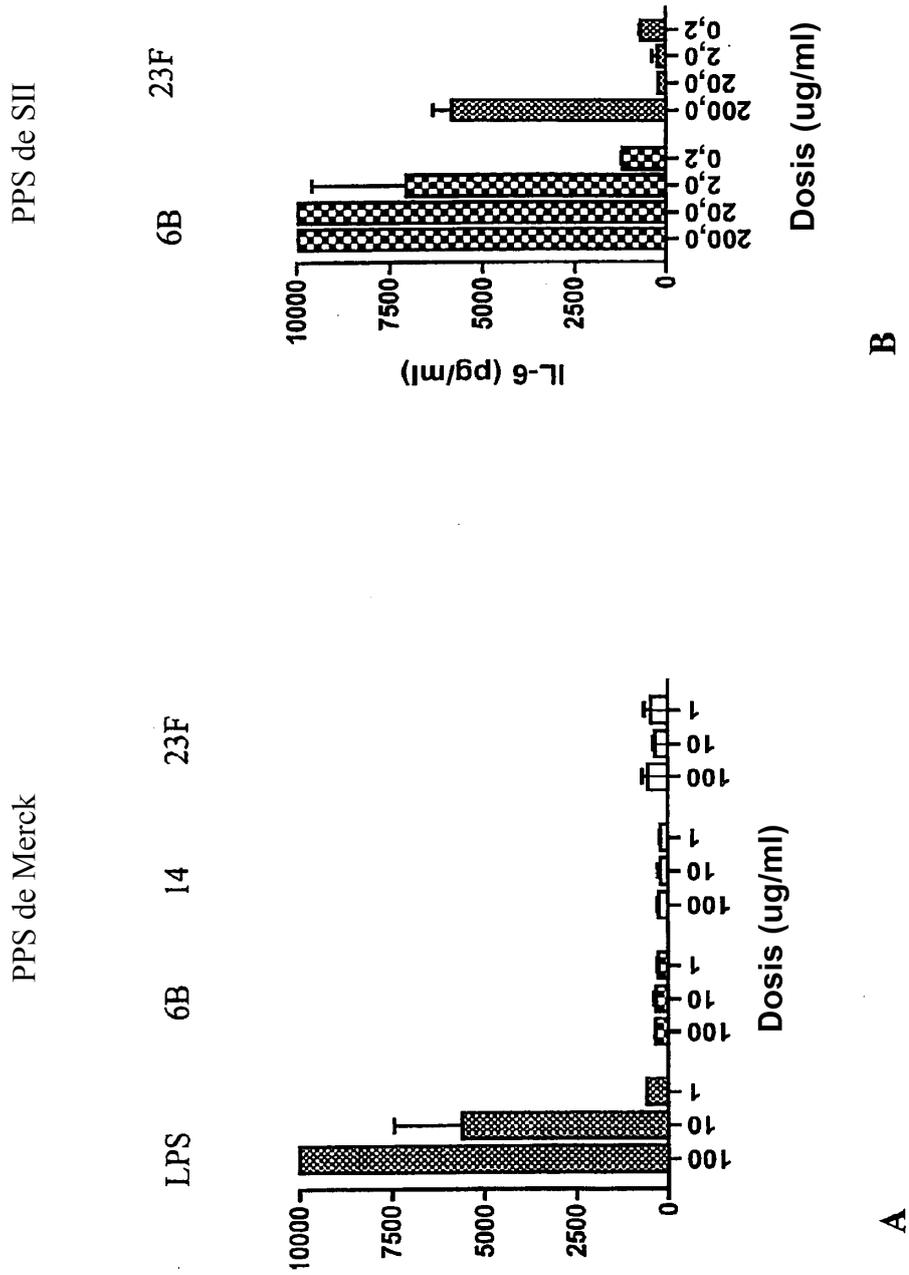


Figura 9

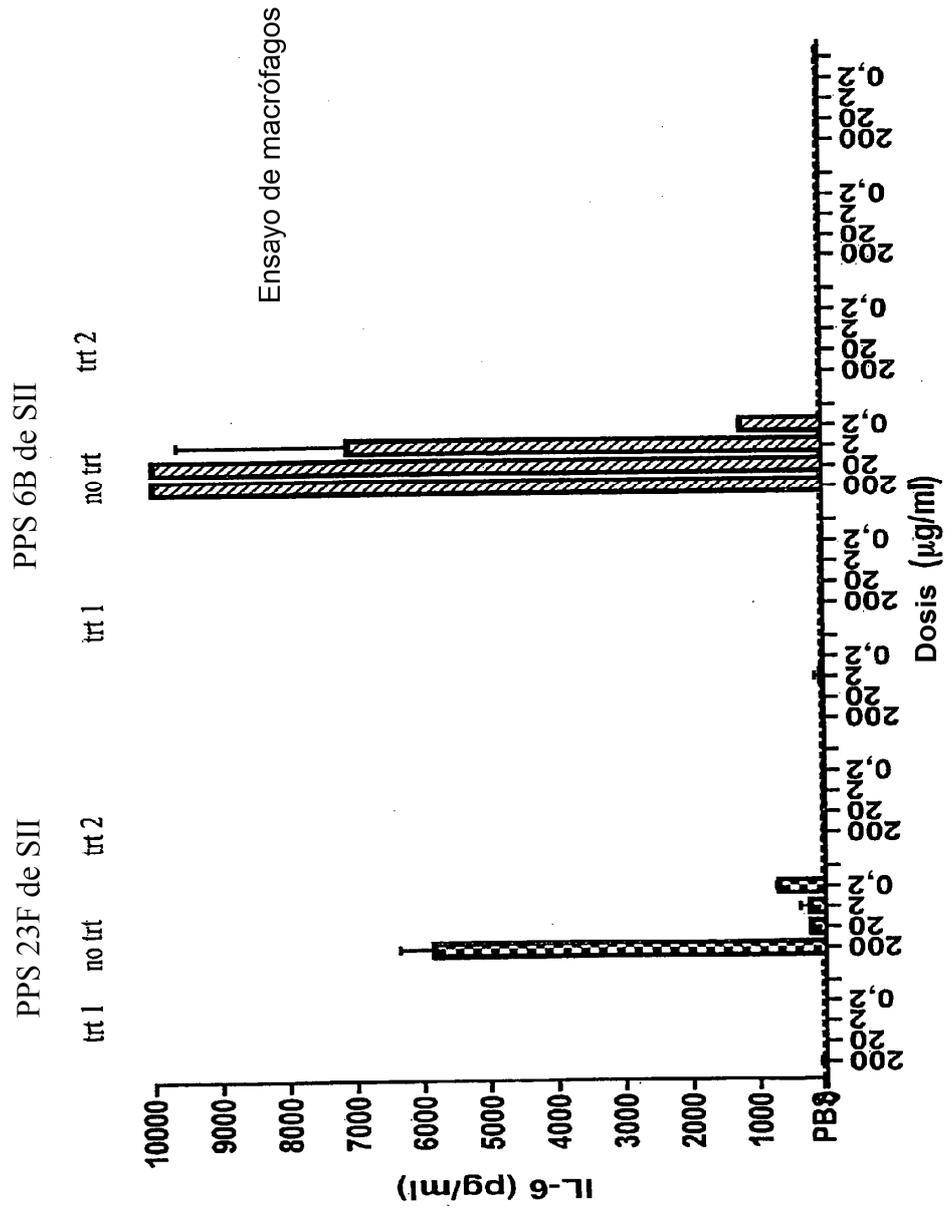


Figura 10

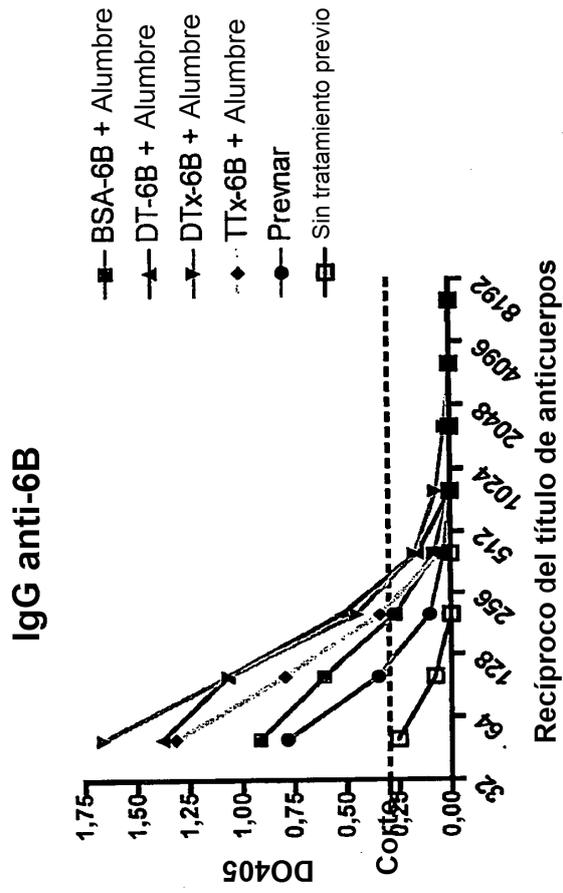


Figura 11

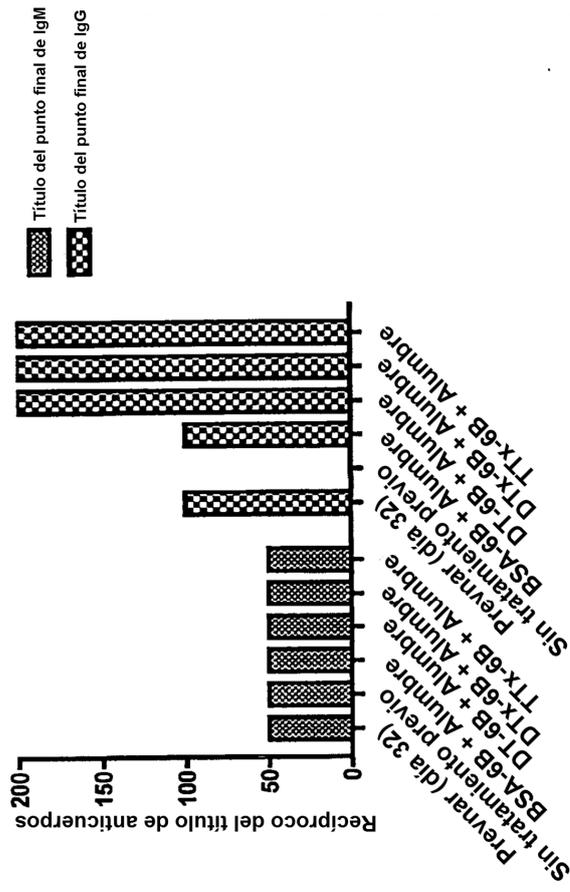


Figura 12

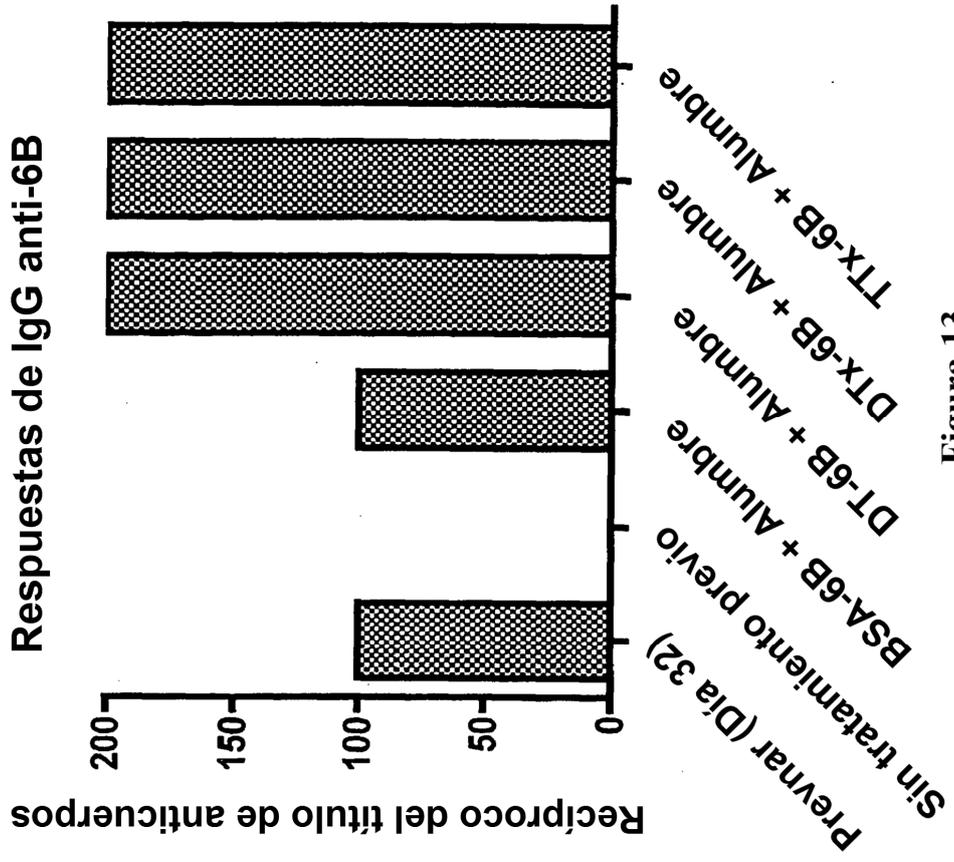


Figura 13

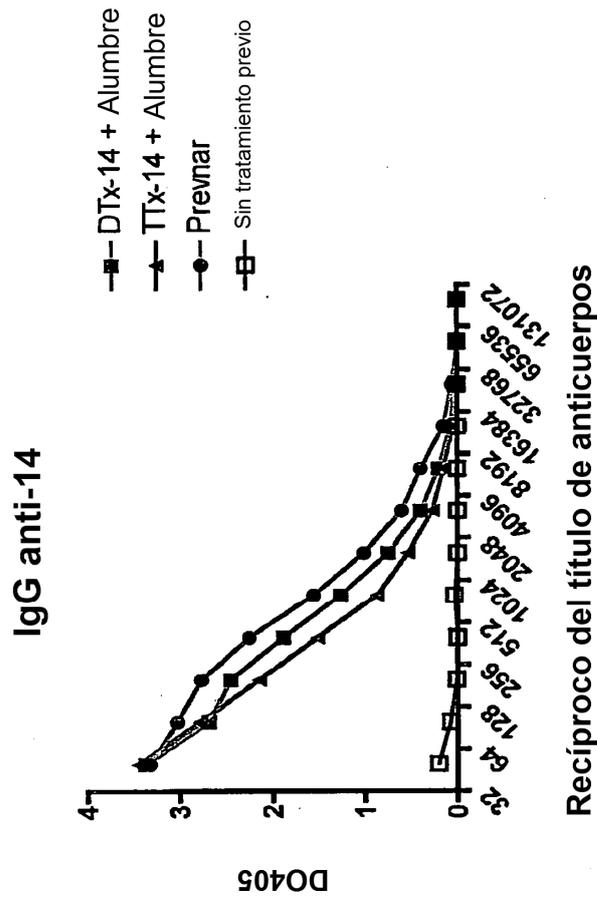


Figura 14

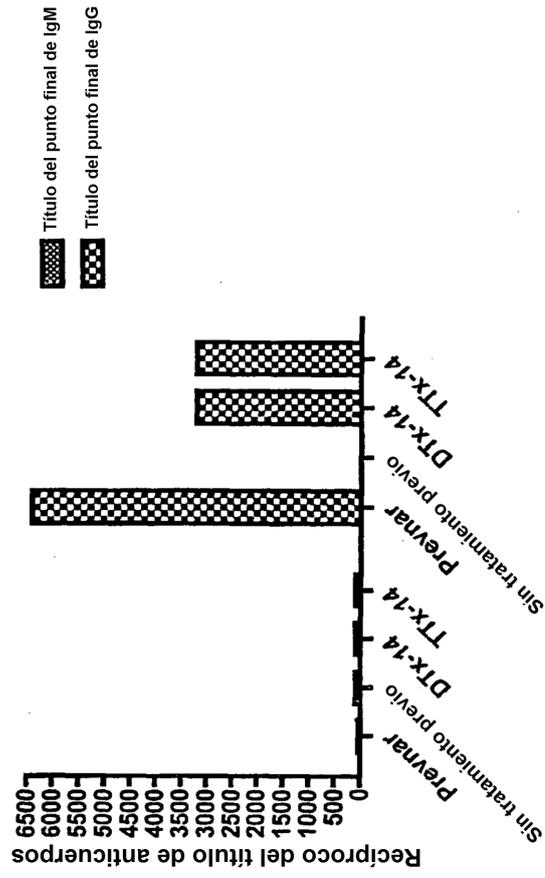


Figura 15

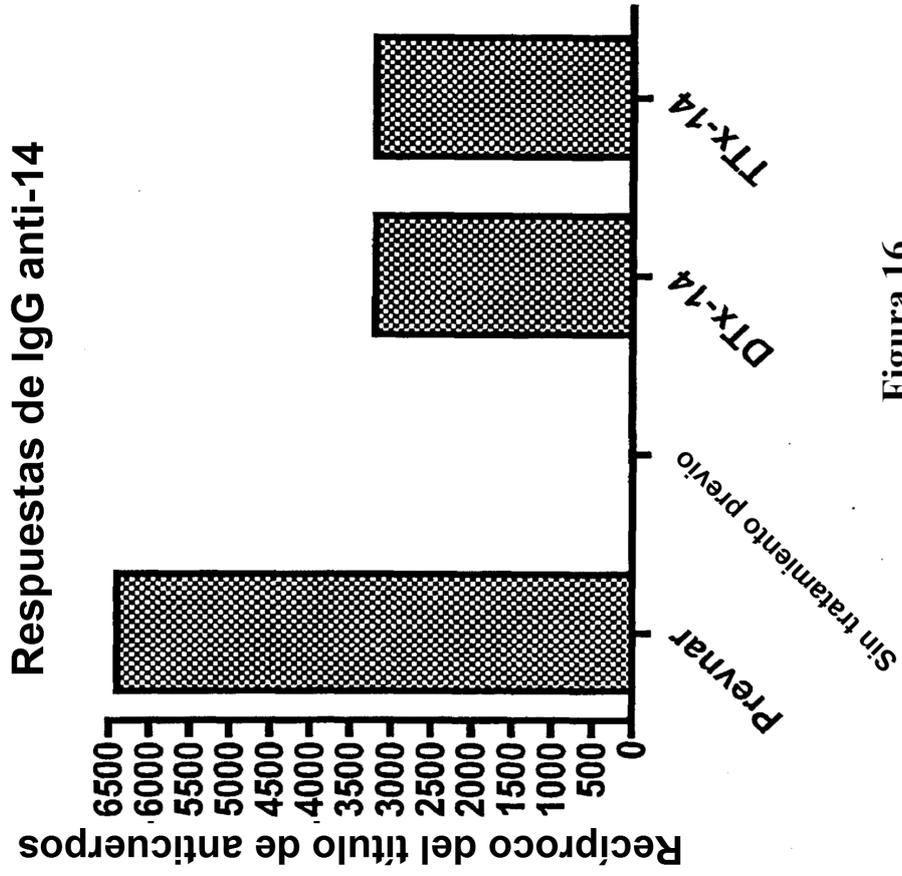


Figura 16