

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 045**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2015 PCT/EP2015/066988**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2015 E 15742232 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3174553**

54 Título: **Vacunas de productos glicoconjugados que comprenden unidades básicas de una construcción molecular que expresa múltiples epítomos incorporados para la formulación de una vacuna de amplio espectro contra infecciones debidas a bacterias enteropatógenas**

30 Prioridad:

25.07.2014 IT MI20141361

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

12.06.2018

73 Titular/es:

**BIOSYNTH S.R.L. (100.0%)
Zona Industriale Loc Sentino
I-53040 Rapolano Terme, IT**

72 Inventor/es:

PORRO, MASSIMO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 045 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 productos glicoconjugados que comprenden unidades básicas de una construcción molecular que expresa múltiples epítomos incorporados para la formulación de una vacuna de amplio espectro contra infecciones debidas a bacterias enteropatógenas

- 5 La presente invención se refiere a antígenos glicoconjugados que expresan múltiples epítomos incorporados y a vacunas glicoconjugadas polivalentes destinadas a la protección de mamíferos, como se define en las reivindicaciones y particularmente para la protección de la población humana frente bacterias enteropatógenas, tales como la bacteria anaerobia Gram-positiva *Clostridium difficile* y las bacterias Gram negativas *Salmonella typhi*, *Escherichia Coli*, *Vibrio Cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* y/o frente a infecciones virales gastrointestinales debidas a norovirus humanos.

Clostridium difficile es un bacilo Gram-positivo formador de esporas que produce dos Exotoxinas (Enterotoxina A y Citotoxina B) que son patógenas para los seres humanos.

- 15 *C. difficile* es la principal causa de diarrea infecciosa relacionada con antibióticos en pacientes ancianos hospitalizados en países desarrollados (Simor *et al.*, 2002). Los síntomas de la enfermedad asociada con *C. difficile* (EACD) varían de diarrea a colitis grave, megacolon tóxico, sepsis y muerte. En los últimos años, los aumentos de la incidencia, gravedad y recurrencia de la enfermedad se deben en gran parte a la aparición de cepas hipervirulentas asociadas con brotes epidémicos en el hospital combinada con un aumento de la resistencia a los antibióticos de uso común (Rupnik. *et al.*, 2009).

- 20 Se ha informado de que una vacuna profiláctica capaz de neutralizar la Enterotoxina A y la Citotoxina B de *C. difficile*, las dos toxinas del patógeno, es el ejemplo candidato de vacuna en desarrollo industrial (Donald R. *et al.*, 2013).

- 25 Las toxinas A y B son proteínas muy grandes de 308 kDa y 270 kDa, respectivamente, que están estructuralmente relacionadas, compartiendo dominios funcionales homólogos que median la captación intracelular y el suministro de una glucosiltransferasa citotóxica.

- 30 La Toxina A (Enterotoxina) se compone de 2.710 AA y muestra en su secuencia 223 residuos de Lys (8,22% de cationicidad); la Toxina B (Citotoxina) se compone de 2.366 AA y muestra en su secuencia 156 residuos de Lys (6,59% de cationicidad) (como referencia véase el sitio web: <http://www.uniprot.org/uniprot/P16154> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGG91548.1>). Aunque estas dos toxinas difieren individualmente en su potencia y efectos en modelos "*in vivo*", estudios anteriores en modelos animales sugieren que ambas contribuyen a la enfermedad en infecciones naturales (Lyerty *et al.*, 1985). Además, la vacunación tanto con Toxina A como con Toxina B - pero no con cualquiera de ellas individualmente - confería protección en un modelo de infección de hámster (Libby J.M. *et al.*, 1982).

- 35 El reconocimiento de la capacidad de la respuesta inmunitaria humoral para controlar la EACD provocó el uso con éxito de la inmunoterapia pasiva con inmunoglobulina humana combinada que contiene anticuerpos anti-Toxina A y B para tratar la EACD grave (Salcedo J. *et al.*, 1997). Además, la reducción en la recurrencia de la EACD se logró en un ensayo clínico de Fase I con anticuerpos monoclonales anti-Toxina A y B combinado con la terapia antibiótica convencional (Lowy I. *et al.*, 2010).

- 40 Además, en un pequeño estudio con tres pacientes con EACD recidivante crónica, una vacuna en investigación que utilizaba antígenos Toxoides A y B inactivados con formalina previno la recurrencia de EACD (Sougioultzis S. *et al.*, 2005).

- 45 En conjunto, estas observaciones proporcionan validación y fomentan un mayor desarrollo de vacunas basadas en Toxina A y basadas en Toxina B de *C. difficile* para prevenir la EACD. Como se recordó anteriormente, ahora hay dos vacunas candidatas en ensayos clínicos, que se basan en las dos proteínas toxoides A y B recombinantes/tratadas con formalina.

- 50 Las estrategias para desarrollar vacunas basadas en especificidades únicas para los Toxoides de *C. difficile* (ya sean destoxificadas mediante tratamiento con formalina o ya sea mediante tecnología de ADN recombinante) están bien documentadas, como se recordó anteriormente. También están bien documentados los estudios para utilizar enterotoxina A recombinante (rARU) de *C. difficile* como proteína transportadora para cada uno de los Ps capsulares de *S. flexneri* tipo 2a, *E. coli* K1 y *Neumococo* tipo 14 (Pavliakova D. *et al.*, 2000) preparada en forma de productos conjugados individuales. Claramente, la administración simultánea de los tres productos conjugados individuales inevitablemente da como resultado una sobrecarga para el sistema inmunitario del anfitrión debido a la cantidad total, distinta de la heterogénea, de la proteína portadora inyectada, a saber, la unidad repetitiva recombinante de Enterotoxina A de *Clostridium difficile* (respectivamente 1,29 µg, 3,9 µg y 8,08 µg de rARU para cada producto conjugado Pn14-rARU, SF-rARU y K1-rARU).

- 55

5 Muy recientemente, las partes estructurales de las dos toxinas se han utilizado como portadores no tóxicos para el antígeno Ps II de *C. difficile* (Romano M. et al, 2014). A pesar de que *C. difficile* también produce tres Ps capsulares diferentes, la evidencia apunta hacia las dos Toxinas como diana para combatir eficazmente la patología, como en los casos históricos de infecciones por difteria y tétanos.

10 Ninguno de estos trabajos previos, sin embargo, ha informado sobre la posibilidad de preparar una vacuna entérica de amplio espectro para inducir inmunidad contra varios antígenos de carbohidratos de bacterias enteropatógenas resistentes a los antibióticos (múltiples especificidades) en un anfitrión humano, particularmente en un niño, mientras se utiliza la cantidad mínima de proteínas portadoras para reducir la carga antigénica de las vacunas en el sistema inmunitario del anfitrión, a la vez que se mantiene la actividad inmunogénica específica y la protección in vivo que se puede lograr cualitativamente administrando productos conjugados monovalentes. Sin embargo, los modelos animales no permiten extraer conclusiones sobre los aspectos cuantitativos de los títulos de anticuerpos inducidos por los antígenos múltiples de la invención, en comparación con los monovalentes, ya que es bien sabido por los expertos en el campo que solo los bebés humanos pueden discriminar confiablemente entre la actividad dependiente de células T coadyuvantes eventualmente diferente de diferentes modelos de entidades de productos conjugados.

15 PAVLIAKOVA D et al. ilustran una vacuna de producto conjugado que contiene una toxina recombinante de *Clostridium difficile* como proteína portadora. La proteína portadora está conjugada con un polisacárido de tipo 14 neumocócico, K1 de *E. coli* o tipo 2a de *Shigella flexneri*. Se provocó una respuesta inmunitaria contra la proteína portadora y el polisacárido (Pavliakova et al., "Clostridium difficile recombinant toxin A repeating units as a carrier protein for conjugate vaccines: studies of pneumococcal type 14, Escherichia coli K1, Shigella flexneri Type 2a polysaccharides in mice", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR CIMROBIOLOGY, US, vol. 68, núm. 4, 1 de Abril de 2000 (01-04-2000), páginas 2161-2166). La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. El autor de la presente invención ha obtenido ahora construcciones moleculares de múltiples epítopos como unidad básica para la preparación de una vacuna de producto glicoconjugado de múltiples epítopos para su uso como

20 vacuna entérica de amplio espectro para la protección de la población humana contra bacterias enteropatógenas. De hecho, el autor de la presente invención se centra en el problema urgente que se conoce actualmente sobre varios patógenos intestinales que se han vuelto resistentes a los antibióticos: la bacteria anaerobia Gram-positiva *Clostridium difficile* y las bacterias Gram negativas *Salmonella typhi*, *Escherichia Coli*, *Vibrio Cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella cholerasuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a su creciente resistencia a los antibióticos, las infecciones intestinales debido a este panel de bacterias a menudo pueden conducir a la sepsis con la consiguiente muerte del anfitrión.

35 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es una construcción molecular multivalente antigénica que consiste en unidades básicas que comprenden las proteínas desintoxicadas portadoras dependientes de células T coadyuvantes seleccionadas entre Enterotoxide A y Citotoxide B de *Clostridium difficile* unidas covalentemente a un mínimo de tres estructuras de carbohidrato de bacterias enteropatógenas seleccionadas entre polisacáridos bacterianos o lipopolisacáridos destoxificados (tales como LPS o endotoxoides destoxificados con SAEP) de diferente especificidad serológica, en donde cada estructura de carbohidrato comprende al menos uno de los epítopos básicos repetitivos que consiste en un mínimo de cinco a doce residuos de monosacáridos (preferiblemente un mínimo de ocho a doce residuos de monosacáridos), en donde al menos un mol de proteína portadora está unido covalentemente a al menos un mol de estructuras de carbohidrato específico de tipo o específico de grupo, o a la cantidad total de estructuras de carbohidrato consideradas como la suma de al menos tres carbohidratos específicos de tipo o específicos de grupo. Preferiblemente, dichos residuos de sacáridos se evalúan mediante determinación de la masa molecular y espectroscopía de RMN, midiéndose antigénicamente dichos epítopos básicos repetitivos por su reactividad con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de tipo o específicos de grupo a través de la determinación de sus respectivos valores de CIM50 en la inhibición de su sistema de referencia de Polisacárido-Anticuerpo homólogo.

50 Las bacterias enteropatógenas de acuerdo con la presente invención son aquellos patógenos intestinales que se han vuelto resistentes a los antibióticos tales como: la bacteria anaerobia Gram-positiva *Clostridium difficile* y las bacterias Gram negativas *Salmonella typhi*, *Escherichia Coli*, *Vibrio Cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella cholerasuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*.

55 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las proteínas toxoides Enterotoxide A y Citotoxide B de *Clostridium difficile* se destoxifican mediante un método químico, tal como el tratamiento con formalina, como se conoce históricamente para los toxoides diftérico y tetánico, o mediante la tecnología de ADN recombinante.

60 En las construcciones moleculares de acuerdo con la presente invención, cada una de las dos proteínas toxoides puede soportar un mínimo de tres polisacáridos de diferente antigenicidad (tales como oligosacáridos o polisacáridos que derivan de polisacáridos capsulares bacterianos) o un mínimo de tres lipopolisacáridos destoxificados (o LPS, endotoxina) de diferente antigenicidad. Las construcciones moleculares obtenidas de esta manera con LPS, sin

embargo, resultan ser tóxicas porque el radical Lípido A de LPS está presente activamente en la estructura molecular y puede activar, a través de la interacción con los receptores de tipo CD14 y TLR4, la cascada de citocinas proinflamatorias típica de LPS. Con el fin de desarrollar y lograr el uso seguro de la entidad conjugada Toxoide-LPS, la estructura del LPS debe por lo tanto someterse a la destoxificación.

5 Esto se puede lograr mediante:

1) escisión del radical de lípido A, o

2) saturación del sitio de unión a lípido A a través de una estrategia específica que utiliza los péptidos sintéticos antiendotoxina (SAEP) para obtener endotoxoides (alternativamente denominados LPS destoxificados con SAEP, endotoxina destoxificada con SAEP) que conservan su completo repertorio antigénico supramolecular en forma de estructuras tipo micela (documento WO 2004/052394 A1).

El último procedimiento de destoxificación es la realización preferida en el contexto de la presente invención. Específicamente, se prepara un endotoxoide, que se origina a partir de una endotoxina (lipopolisacárido) específica de la especie (inmunotipo) dada de acuerdo con el concepto científico referido por Rustici et al. (Science 259: 361-365, 1993) y en los detalles moleculares previamente divulgados referidos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.951.652 y en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.507.718.

Por lo tanto, un endotoxoide es una entidad molecular compuesta por un complejo equimolar de SAEP, péptidos anti-endotoxina sintéticos y LPS (endotoxina), que, en forma de un producto conjugado de múltiples epítomos con un toxoide (A o B) de *C. difficile* satisface la ecuación química:



20 (véase también el Ejemplo 3 más adelante).

De acuerdo con la realización preferida de las construcciones moleculares de la presente invención, los antígenos de polisacáridos capsulares se pueden seleccionar del grupo que comprende *Escherichia coli* Tipos K (1, 2, 5, 12,13), *Salmonella typhi* (Antígeno Vi), *Vibrio cholerae* 0139 y *Clostridium difficile*.

25 *Clostridium difficile*, como bacteria Gram-positiva, también presenta una cápsula de carbohidratos que implica al menos tres estructuras de Ps diferentes (Psl, PslI y PslII).

De acuerdo con una realización alternativa de la construcción molecular de la presente invención, las dos proteínas toxoides sirven como portadores dependientes de células T coadyuvantes para productos glicoconjugados de los lipopolisacáridos destoxificados (preferiblemente LPS o endotoxoides destoxificados con SAEP) específicos para *Shigella flexneri* 2a, *Vibrio cholerae* 01, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* 0157/101/111, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi* A, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* tipo 1 y *Salmonella choleraesuis*.

Las construcciones moleculares de acuerdo con la invención inducen la especificidad serológica de las dos proteínas transportadoras (Enterotoxoide A y Citotoxoide B de *C. difficile*) y a cada una de las al menos tres estructuras de carbohidrato transportadas (brevemente denominadas Ps o LPS/Endotoxoide) unidas a cada una de las dos proteínas transportadoras, de modo que los anticuerpos específicos relativos exhiban actividad neutralizadora para las toxinas naturales homólogas (Enterotoxina A y Citotoxina B) de *Clostridium difficile* así como actividad bactericida para *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cólera*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi* A, *Shigella dysenteriae* (otros antígenos de carbohidratos preferidos son de *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella sonnei* y del propio *C. difficile*).

40 De acuerdo con lo anterior, y como una serie de ejemplos no limitantes, el autor ha preparado las siguientes construcciones moleculares:

- Enterotoxoide A unido covalentemente a los Ps de *S. typhi* (Vi) *V. cholerae* (0139) y *E. coli* (K1);
- Citotoxoide B unido covalentemente a los mismos tres Ps de *S. typhi* (Vi) *V. cholerae* (0139) y *E. coli* (K1);
- Enterotoxoide A unido covalentemente a los LPS/Endotoxoides de *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A y *S. dysenteriae*;
- Citotoxoide B unido covalentemente a los mismos tres LPS/Endotoxoides de *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A y *S. dysenteriae*.

La invención se refiere adicionalmente a la construcción molecular multivalente antigénica anterior para su uso en una vacuna para la protección de un sujeto de las infecciones debidas a al menos una bacteria enteropatógena seleccionada entre *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* o una combinación de los mismos

En una realización preferida, se puede utilizar una sola o una combinación de diferentes construcciones moleculares multivalentes antigénicas para la preparación de la vacuna.

5 Un objeto adicional de la presente invención es una formulación de vacuna que comprende al menos una construcción molecular multivalente antigénica como anteriormente en un vehículo fisiológicamente aceptable, opcionalmente junto con un coadyuvante o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Las construcciones moleculares antigénicas pueden tener un patrón homogéneo o mixto de antígeno transportador y antígenos transportados. El término antígeno transportador se refiere a las proteínas toxoides Enterotoxide A o Citotoxide B de *C. difficile*; el término antígenos transportados se refiere a las estructuras de carbohidrato (denominadas brevemente Ps capsular o LPS/endotoxide) unidas a cada una de las dos proteínas transportadoras. El término homogéneo o mixto se refiere a la fuente de los antígenos transportados con respecto al antígeno transportador (es decir, todos los antígenos transportadores y transportados son originarios de *C. difficile*; los antígenos transportados se originan a partir de los mismos o diferentes patógenos intestinales).

De acuerdo con una realización preferida de la formulación de vacuna de la invención, la dosis de cada antígeno transportador y/o antígenos transportados oscila entre 0,1 y 100 µg, siendo preferiblemente 1-10 µg.

15 Preferiblemente, dichas formulaciones de vacuna comprenden adicionalmente un coadyuvante mineral o químicamente sintético o biológico. Se pueden utilizar coadyuvantes minerales o químicamente sintéticos o biológicos con la construcción molecular descrita en esta solicitud, con el fin de beneficiarse de cualquier refuerzo inmunológico que pueda ser eficaz para disminuir la dosis inmunogénica óptima en seres humanos para reducir adicionalmente la cantidad total de proteína transportadora. Particularmente, los coadyuvantes inorgánicos preferidos en las formulaciones de vacuna de acuerdo con la invención para uso en seres humanos se seleccionan entre fosfato de aluminio (AlPO₄) e hidróxido de aluminio; los coadyuvantes orgánicos preferidos se seleccionan entre coadyuvantes con una base de escualeno tales como MF59, QF21, Addavax; los antígenos biológicos preferidos se seleccionan entre los antígenos bacterianos monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trehalosa (coadyuvante de Ribi).

20 En las formulaciones de vacunas para uso en el campo veterinario, se prefiere el coadyuvante de Freund (completo o incompleto). La dosis de coadyuvante puede oscilar entre 0,1-1 mg/dosis, siendo preferiblemente de 0,5 mg/dosis.

Más preferiblemente, dicha formulación es adecuada para la administración por vía subcutánea o intramuscular o intradérmica o transcutánea. Convenientemente, dicha administración se puede llevar a cabo mediante inyección con jeringa convencional o utensilios sin aguja.

30 Las formulaciones de vacunas de acuerdo con la invención se pueden administrar de acuerdo con un protocolo que requiere administraciones únicas o múltiples, de acuerdo con las instrucciones del médico, pediatra o veterinario.

35 La invención se refiere adicionalmente a una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro como se definió anteriormente para su uso en el campo médico humano o veterinario para la protección de un sujeto de las infecciones debidas a al menos un patógeno enterobacteriano seleccionado entre *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* o una combinación de los mismos. Preferiblemente, dicho sujeto a tratar pertenece a la población pediátrica y a la población de edad avanzada.

40 La formulación real de tal vacuna (p.ej.: la especificidad de especie de la bacteria entérica Gram negativa de la que se derivan los Ps y LPS) puede depender de la epidemiología regional de manera que cada tríada de productos conjugados antigénicos, aunque se utilicen siempre una o ambas proteínas transportadoras Enterotoxide A y Citotoxide B de *C. difficile*, portará a propósito antígenos PS o LPS/endotoxoides específicos de acuerdo con la epidemiología regional seleccionada.

45 En una realización particular de la presente invención, la formulación de vacuna comprende al menos dos construcciones moleculares antigénicas diferentes en las que cada una de las dos proteínas Enterotoxide A y Citotoxide B de *C. difficile* puede servir como proteína transportadora para los tres polisacáridos (PsI, PsII y PsIII) de *C. difficile* de modo que las dos tríadas combinadas de antígenos conjugados representarán una vacuna específica limitada a las infecciones de *C. difficile* donde la actividad antitóxica inducida por los dos toxoides proteicos puede ser paralela a la actividad local y sistémica anti-capsular que da como resultado la eliminación de la bacteria por parte del sistema inmunitario del anfitrión.

50 Tales construcciones moleculares de una sola tríada también se han formulado como composiciones combinadas multivalentes que contienen ambos tipos de modelos moleculares antigénicos para lograr el espectro antigénico más amplio, tales como:

Enterotoxide A unido covalentemente a los Ps de *S. typhi* (Vi), *V. cholerae* (0139) y *E. coli* (K1) combinado con Citotoxide B unido covalentemente a los mismos tres antígenos Ps;

Enterotoxide A o Citotoxide B unidos covalentemente a los Ps de *S. typhi* (Vi), *V. cholerae* (0139) y *E. coli* (K1) combinados con Citotoxide B o Enterotoxide A covalentemente unido a los tres antígenos endotoxoides de *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* y *S. dysenteriae*.

5 Se ha informado recientemente sobre la evidencia experimental de que los norovirus humanos y de ratón infectan las células B in vitro, y probablemente in vivo, mediante la participación de bacterias entéricas que funcionan como un factor estimulador de la infección por norovirus. Se ha sugerido que este sinergismo biológico es la base del mecanismo por el cual los norovirus pueden volverse infecciosos y desarrollar gastroenteritis epidémica y esporádica en seres humanos (Jones M.K. et al., Science, 346: 755-759, 2014).

10 De acuerdo con estas observaciones, los anfitriones murinos sometidos a tratamiento con antibióticos para agotar la microbiota intestinal, han mostrado una reducción significativa de la replicación de norovirus de ratón en los experimentos referidos por los autores.

15 A partir de esta evidencia, el autor de la presente solicitud encontró el principio de la selección como objetivo del mundo en continua expansión de bacterias enteropatógenas resistentes a antibióticos con las composiciones de vacuna descritas en la presente memoria para posiblemente limitar, en paralelo a infecciones bacterianas entéricas, la replicación de norovirus responsables de gastroenteritis aguda.

20 La gastroenteritis por norovirus es una enfermedad generalizada y potencialmente grave que se caracteriza por la aparición aguda de náuseas, vómitos, cólicos abdominales, diarrea y, en ocasiones, fiebre. Los norovirus son altamente infecciosos y se transmiten fácilmente de persona a persona o en entornos contaminados. Los brotes epidémicos ocurren en entornos comunitarios, particularmente en hospitales, hoteles, escuelas, guarderías y hogares de ancianos, con un coste socioeconómico creciente para las familias, el sistema de atención médica y las empresas. Las unidades militares se ven significativamente afectadas cuando el virus ataca, ya que los brotes tienen impacto sobre la preparación para el combate. Se informa sobre resultados clínicos graves en adultos mayores, niños e individuos inmunocomprometidos en quienes la infección puede conducir a complicaciones sustanciales e incluso puede conducir a la muerte. Se estima que, en todo el mundo, los norovirus causan uno de cada cinco casos de gastroenteritis viral. Se estima que 300 millones de casos anuales de infección por norovirus contribuyen a aproximadamente 260.000 muertes, principalmente en países de bajos ingresos. Los norovirus se clasifican en al menos 5 genogrupos y en al menos 40 genotipos; su distribución en áreas geográficas seleccionadas ha sido recientemente evaluada en niños y ancianos, con una incidencia de 1.475 casos/100.000 personas-año en niños pequeños (≤ 5 años) y 585 casos/100.000 personas-año en ancianos (≥ 65 años) (Chan M. et al, Scientific Reports, 2015). Con el tiempo, los norovirus evaden la inmunidad natural por deriva antigénica, lo que les permite escapar de los anticuerpos producidos en respuesta a infecciones anteriores.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es la provisión de una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro para su uso en la prevención y/o tratamiento de bacterias enteropatógenas que a continuación se pueden dirigir, en paralelo, a infecciones gastrointestinales víricas debidas a norovirus humanos.

35 Los esfuerzos recientes para desarrollar una vacuna contra el norovirus se han centrado en las partículas similares a virus (VLP), que se construyen a partir de moléculas de la cápside del virus (cubierta exterior). En una prueba clínica de fase I, una vacuna de VLP multivalente provocó la generación de anticuerpos, pero no confirió inmunidad a la cepa de virus sometida a ensayo. Sin embargo, en un estudio más reciente, Lindesmith y colaboradores (2015) caracterizaron muestras de suero de diez participantes en pruebas clínicas con vacunas de VLP multivalentes para anticuerpos contra VLP de vacunas y también contra VLP que representan virus que no estaban contenidos en la vacuna. Los investigadores encontraron que la vacuna de VLP puede provocar rápidamente respuestas de anticuerpos a una amplia gama de VLP de vacunas y no de vacunas, incluyendo dos VLP que representan norovirus humanos que podrían no haberse encontrado anteriormente. En general, los anticuerpos contra las cepas de norovirus a los que los participantes habían estado expuestos previamente, dominaron la respuesta inmunitaria. Estos hallazgos pueden alentar el desarrollo de una vacuna basada en norovirus, suponiendo que este enfoque pueda superar la capacidad de los norovirus para evadir la inmunidad por deriva antigénica. En cualquier caso, esta sería una estrategia dirigida a contener eventualmente el virus durante la fase de la infección en la que las partículas del virus se están diseminando de las células bacterianas que lo hospedan, en lugar de bloquear la replicación del virus en la base, una vez que está aún dentro de las bacterias enteropatógenas que lo están protegiendo, como propone el autor de la presente Solicitud mediante el uso de una vacuna de amplio espectro dirigida a bacterias enteropatógenas. Finalmente, el uso concomitante y/o paralelo de estas dos estrategias (p.ej., el uso de las dos vacunas dirigidas contra el norovirus y su anfitrión bacteriano) podría constituir una poderosa herramienta para lograr una protección antiviral de amplio espectro para el ser anfitrión humano.

55 La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de conjugación para preparar la construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con la invención (que emplea la misma química descrita en la patente EP 1501542), en donde cada una de las al menos tres estructuras de carbohidrato seleccionadas entre:

-polisacáridos capsulares de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* o

-lipopolisacáridos de *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*

5 se activa químicamente a monofuncionalidad o polifuncionalidad mediante desacoplamiento de O-des-hidrógeno a través de oxidación y aminación reductiva formando enlaces reducidos imina con un espaciador de alquildiamina, a continuación se modifica para formar ésteres activos, acoplándose finalmente y simultáneamente tales estructuras de carbohidrato derivadas de ésteres a los grupos amino de la proteína transportadora polifuncional Citotoxoide B o Enterotoxide A de *C. difficile* a través de la formación de enlaces amida; en donde al menos un mol de proteína transportadora se hace reaccionar con al menos un mol de estructuras de carbohidrato, considerando una cantidad total como la compuesta por la suma molar de cada una de las al menos tres estructuras de carbohidrato específicas de tipo o específicas de grupo. Preferiblemente, dichas estructuras de carbohidrato se activan químicamente a sus correspondientes derivados ácido diamino-butírico y los ésteres activos son ésteres succinimidílicos.

10 Como ejemplo, la activación química de la tríada de polisacáridos de la cápsula de *S. typhi*, *E. coli* y *V. cholerae* a su Ps-DAB homólogos (derivado de ácido diaminobutírico) se ha realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por el Solicitante en la Reivindicación 1 del documento EP 1501542, si bien las proteínas transportadoras polifuncionales eran el Enterotoxide A y el Citotoxide B de *C. difficile*. Alternativamente, el procedimiento de conjugación para preparar las construcciones moleculares multivalentes antigénicas de la invención emplea la química descrita en la reivindicación 8 del documento EP 1501542 que implica el acoplamiento simultáneo (o acoplamiento paso a paso) de los grupos amino de las proteínas transportadoras poli-funcionales Citotoxide B o Enterotoxide A de *C. difficile* con al menos tres estructuras diferentes de carbohidratos seleccionadas entre

20 - polisacáridos capsulares de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* o

- lipopolisacáridos de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*

25 a través de una aminación reductiva que forma un enlace reducido imina, activándose tales estructuras de carbohidrato previamente a monofuncionalidad o polifuncionalidad, con o sin espaciadores, mediante desacoplamiento de O-des-hidrógeno mediante oxidación;

en donde al menos un mol de proteína transportadora se hace reaccionar con al menos un mol de estructuras de carbohidrato, considerando una cantidad total como la compuesta por la suma molar de cada una de las al menos tres estructuras de carbohidrato específicas de tipo o específicas de grupo.

30 De acuerdo con la presente invención, el término mol referido tanto a la proteína transportadora como a los antígenos de carbohidratos específicos abarca la unidad de medida general (un mol) o una fracción de la misma (es decir, micromol o nanomol o picomol, todos representativos de una fracción).

35 Cuando el procedimiento de conjugación de acuerdo con la invención contempla lipopolisacáridos, estos deben destoxificarse. Por lo tanto, el procedimiento de conjugación comprende adicionalmente una etapa adicional de destoxificación de dichos lipopolisacáridos alternativamente mediante a) escisión del radical del Lípido A antes o después de llevar a cabo la reacción de acoplamiento, o b) saturación del sitio de unión del Lípido A a través de una estrategia específica que utilice los péptidos sintéticos anti-endotoxina (SAEP, como el SAEP2 ver Rustici et al., Science 259: 361-365, 1993) antes o después de que se realice la reacción de acoplamiento.

40 Preferiblemente, tales lipopolisacáridos destoxificados se obtienen mediante el último procedimiento revelado por el mismo autor en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.951.652 (véase la página 16 y la Reclamación 1) y la Patente de Estados Unidos Núm. 7.507.718 (véanse las páginas 33-34 y la reivindicación 17) para obtener los endotoxoides correspondientes que retienen las características antigénicas óptimas de las estructuras de LPS de tipo micelas supramoleculares para la expresión óptima de las propiedades inmunogénicas relativas.

45 Además de los métodos anteriores de destoxificación, se pueden utilizar otros métodos para el propósito y, entre otros, se puede considerar la destoxificación de LPS mediante ingeniería genética mediante la modificación de la ruta enzimática que conduce a la síntesis del lípido A y la destoxificación por enzimas o hidrólisis química de las cadenas de ácidos grasos unidas a ésteres presentes en la estructura del Lípido A.

50 Además, en una realización preferida del procedimiento de conjugación de la invención, las estructuras de carbohidrato de la etapa a) comprenden al menos uno de los epítomos básicos repetitivos que consisten en un mínimo de cinco a doce residuos de monosacáridos según se evalúa mediante determinación de la masa molecular y espectroscopia de RMN, evaluándose antigénicamente dichos epítomos básicos repetitivos por la reactividad con anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de tipo o específicos de grupo mediante la determinación de sus respectivos valores de CIM50 en la inhibición de su sistema de referencia homólogo de polisacárido-anticuerpo.

Representa un objeto final de la presente invención una construcción molecular multivalente antigénica que puede obtenerse mediante el procedimiento de conjugación esbozado anteriormente.

55

Como se puede inferir, el modelo molecular descrito anteriormente puede desarrollarse adicionalmente para que contenga más de tres (por ejemplo, cuatro o cinco) estructuras de carbohidrato diferentes por mol (o fracciones) de portador de proteína, dependiendo esta posibilidad de tres parámetros principales de la construcción molecular:

5 a) las características físico-químicas de la proteína transportadora, cuya estructura debe contener la mayor cantidad posible de residuos de lisina (fuente de grupos $-NH_2$ reactivos);

b) el MW polidisperso seleccionado "ad hoc" de las diferentes estructuras de carbohidrato que presenta una tasa de activación óptima al tiempo que limita los efectos negativos de los fenómenos de impedimento estérico en la reacción de acoplamiento, y

10 c) la eficacia de la química utilizada para la activación de las diferentes estructuras de carbohidrato y para la síntesis de la construcción molecular (la química preferida para una alta eficacia en la activación óptima de las estructuras de carbohidrato es el desacoplamiento de O-des-hidrógeno a través de oxidación, con o sin espaciador, mientras que para una alta eficacia en la reacción de conjugación es a través de la formación de enlaces amida por medio de ésteres activos entre las estructuras de carbohidrato y la proteína transportadora, también es preferible para la reacción de conjugación, la química que utiliza la formación de un enlace reducido imina entre las estructuras de carbohidrato oxidadas por desacoplamiento de O-des-hidrógeno, con o sin espaciadores, y la proteína transportadora, a través de aminación reductiva directa).

El procedimiento de conjugación empleado de acuerdo con la invención prevé la activación en múltiples etapas de (al menos tres) Ps o LPS (que en consecuencia pueden tener indiferentemente, aunque homogéneamente, MW bajo o alto) con el fin de optimizar los rendimientos de acoplamiento con la proteína transportadora.

20 Las características estequiométricas de las presentes construcciones moleculares (razón p/p de Proteína/Ps o Proteína/LPS), que a su vez están relacionadas con la dosis inmunizante de las construcciones moleculares, se han llevado a cabo mediante el método inmunoquímico descrito en la solicitud de patente internacional Núm. PCT/EP2014/051670.

25 Esto ha permitido la posibilidad en la presente invención de determinar la cantidad cuantitativa de Ps o LPS incluso cuando tienen estructuras muy similares si están presentes en la misma construcción molecular.

Finalmente, la presente invención se dirige a limitar la cantidad de proteína transportadora en la formulación de la vacuna al mínimo posible inmunológicamente que está relacionada con el repertorio antigénico más amplio de los antígenos conjugados, con el fin de que contenga la carga antigénica en el sistema inmunitario del anfitrión para las construcciones moleculares obtenibles a través de los procedimientos de conjugación anteriormente descritos. Esta estrategia es coherente con la contención del fenómeno clínico hoy conocido como "interferencia inmunitaria específica del portador" que está relacionada con la cantidad de proteína transportadora utilizada en una composición de vacuna de producto glicoconjugado dada cuando se considera el contexto de otras vacunas administradas durante la ruta de inmunización del anfitrión mamífero (Dagan R. et al., 2010; Lee LH y Blake MS, 2012).

35 En la siguiente sección experimental, la invención se describirá con más detalle de acuerdo con las realizaciones preferidas. Tales realizaciones deben considerarse con fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1:

40 i) *Síntesis del antígeno conjugado tetravalente que comprende polisacáridos de S. typhi (Vi), E. coli (K1) y V. cholerae (O139) con la proteína transportadora Enterotoxide A;*

ii) *Síntesis del antígeno conjugado tetravalente que comprende polisacáridos de S. typhi (Vi), E. coli (K1) y V. cholerae (O139) con la proteína transportadora Citotoxide B.*

Activación química de los tres Ps al Ps-DAB (derivado de ácido diaminobutírico) homólogo

45 Esta etapa se ha realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por el solicitante en la reivindicación 1 (etapa A1) de la patente mencionada anteriormente EP1501542. Se han realizado controles específicos de dicha activación, así como las características obtenidas de las estructuras de Ps activadas utilizando espectroscopía de RMN H^1 según se informa en la solicitud internacional Núm. PCT/EP2014/051670.

Análisis de RMN H^1 de Ps-derivados de DAB

1. Solución de Ps y Ps-derivados de DAB para análisis de RMN

50 Se disuelven 3-4 mg de muestra de polisacárido (PS) o PS-DAB en 0,7 ml de D_2O - tampón fosfato y se transfieren a un tubo para RMN de 5 mm. La concentración de tampón de fosfato preparado en D_2O es 100 mM, pH = 7. Como patrón interno se utiliza sal sódica del ácido trimetilsililpropiónico (TSPA), $(CH_3)_3Si(CD_2)_2COONa$. La concentración

de TSPA es 1 mM.

2. Equipo de RMN

Se utiliza un espectrómetro de RMN de campo alto (600 MHz). Se emplea una cabeza de sonda de alta resolución de 5 mm con bobina de gradiente z capaz de producir gradientes en la dirección z (paralela al campo magnético) con una fuerza de al menos $55 \text{ G} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3. Configuración de experimentos de RMN

Después de la introducción de la muestra dentro del imán, se llevan a cabo todos los procedimientos de rutina: ajuste de sintonía e impedancia "tuning and matching", ajustes de homogeneidad de campo magnético "shimming", calibración de pulso de 90 grados. La presaturación se puede utilizar para suprimir la señal HDO residual. Para una buena presaturación, el centro del espectro (O1) debe establecerse exactamente en la señal HDO (aproximadamente 4,80 ppm), y también es deseable un buen ajuste de homogeneidad de campo magnético.

Después del ajuste de los parámetros de presaturación, se verifican los parámetros de los experimentos de gradiente de difusión. Se utiliza la secuencia de pulso de eco estimulado utilizando gradientes bipolares con un retardo de corriente parásita longitudinal.

4. Huella digital de activación de DAB

Grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ a 3,08 ppm

Grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ a 3,17 ppm

5. % de activación de DAB en Ps

El % de activación de DAB está en el valor intervalo de 0,5-5,0% en moles DAB/moles BRU (Unidad de Repetición Básica del Ps específico de Grupo) con un intervalo molar óptimo 1,5-3,0%.

Derivatización de Ps Vi, Ps 0139, Ps K1 a sus ésteres activos homólogos como derivados Ps-DAB-MSE

Esta etapa se ha realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por el solicitante en la Reivindicación 8 de la Patente Europea EP 1501542, incluida en la presente memoria como referencia.

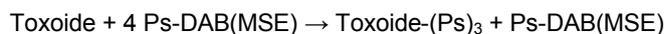
Acoplamiento simultáneo de los tres Ps activados (polifuncionales) a la proteína transportadora (polifuncional) Enterotoxide A o Citotoxide B

La síntesis química del producto conjugado, también conocida como reacción de acoplamiento, se ha realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por el solicitante en la reivindicación 8 de la Patente Europea EP1501542. El procedimiento, sin embargo, se puede considerar aquí como innovador porque las tres reacciones de acoplamiento se ejecutan simultáneamente, en lugar de proceder en una reacción de acoplamiento en el momento (o procedimiento paso a paso).

Este procedimiento puede preferirse al acoplamiento paso a paso de cada antígeno activado por Ps por la simple razón de acortar el tiempo de reacción, mejorando por lo tanto la eficacia de la reacción, siempre que los tres Ps activados estén en condiciones de competir comparativamente en el equilibrio de la reacción de acoplamiento (esta característica incluye MW promedio comparable, intervalo de activación de Ps-DAB comparable y razones estequiométricas comparables entre los grupos de reacción de la proteína y los de los Ps activados).

La estequiometría de reacción apropiada tiene en cuenta la cantidad total de ésteres de succinimidilo con respecto a los tres antígenos PS activados y los grupos amino de la proteína transportadora disponibles. La estequiometría se establece preferentemente para considerar la reactividad de no más de 20-25% de los grupos amino disponibles en la estructura del Enterotoxide A o el Citotoxide B (como ejemplo) para que la proteína conserve óptimamente su repertorio antigénico.

La reacción de acoplamiento de Enterotoxide A o Citotoxide B (brevemente indicados como toxoide) con derivados de Ps-DAB (Ps-DAB) es compatible con la siguiente estequiometría:



Donde la entidad Ps-derivados de DAB(MSE) se refiere al total de partes iguales de cada una de las tres estructuras Ps específico de tipo en la reacción, que produce un producto conjugado con un promedio de 1 mol de proteína para un total de 3 moles de Ps específico de tipo transportados, más el exceso debido a Ps-derivados de DAB(MSE), de acuerdo con lo regido por la constante de equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{[\text{Toxoide} - (\text{Ps})_3][\text{Ps} - \text{DAB(MSE)}]}{[\text{Toxoide}][\text{Ps} - \text{DAB(MSE)}]^4} = \frac{[\text{Toxoide} - (\text{Ps})_3]}{[\text{Toxoide}][\text{Ps} - \text{DAB(MSE)}]^3}$$

La ecuación se refiere a la concentración de los ésteres activos totales (MSE) que derivan de la suma de partes iguales de los antígenos Ps activados por DAB, que a su vez son comparables a la cantidad del conector DAB cuantificado mediante espectrometría de RMN H^1 que está presente en cada antígeno Ps activado (tasa de conversión de Ps-DAB a Ps-DAB(MSE) $\geq 98\%$ sobre una base molar).

- 5 La ecuación química evidencia la glicosilación completa de la proteína transportadora Toxoide. La ecuación también muestra que la reacción de conjugación depende de las concentraciones de ambos reactivos, definiéndose por lo tanto el nucleófilo (Toxoide a través de grupos épsilon- NH_2 de sus residuos de Lys) y el electrófilo (el radical carbonilo de los grupos éster de los derivados de Ps) como reacción S_N2 .

- 10 Las consideraciones anteriores son compatibles con la observación experimental de que el rendimiento más alto en la reacción de glicosilación obtenido con Toxoide como proteína transportadora ha sido 100% de la proteína transportadora y aproximadamente 80% (p/p) de los derivados de Ps-DAB presentes en la reacción, siendo la parte restante de los mismos una baja cantidad de derivados Ps desacoplados necesarios para impulsar el equilibrio hacia el lado derecho.

- 15 En este tipo de reacciones, el solvente afecta a la velocidad de reacción puesto que los disolventes pueden rodear o no al nucleófilo, obstaculizando o no obstaculizando de este modo su aproximación al átomo de carbono. Los disolventes apróticos polares, en general, son mejores disolventes para esta reacción que los disolventes próticos polares puesto que los disolventes próticos polares se solvatarán mediante el enlace de hidrógeno del disolvente para el nucleófilo y, por lo tanto, impedirán que ataque el carbono con el grupo saliente. Un disolvente aprótico polar con baja constante dieléctrica o un extremo dipolo impedido, favorecerá el modo S_N2 de reacción de sustitución nucleófila (los ejemplos preferidos son: DMSO, DMF, tetrahidrofurano, etc.).

- 20 La temperatura de reacción, que afecta a K_{eq} , es la más baja compatible con el uso del disolvente elegido, cuando se considera que la reacción es espontánea (por lo tanto, es exotérmica) y, por lo tanto, generalmente se establece entre una temperatura de 4° y $20^\circ C$.

- 25 Además de la química de conjugación anteriormente detallada, se pueden usar otras químicas para lograr la síntesis del antígeno conjugado multivalente; entre ellos, el acoplamiento directo de la proteína (a través de la aminación reductiva) a los Ps oxidados (a través del desacoplamiento de O-des-hidrógeno) o el uso de conectores heterólogos y químicamente complementarios que pueden servir para activar los Ps y la proteína.

- 30 Asimismo, además de la estrategia de uso de productos químicos que conducen a la obtención de productos conjugados de proteína-Ps entrecruzados multivalentes a través de la poli-funcionalidad de la proteína y la de los componentes Ps, se puede considerar que la síntesis de la construcción molecular multivalente antigénica descrita actualmente se basa en oligosacáridos derivados de Ps capsular o de oligosacáridos de LPS privados de lípido A, activados en su grupo reductor terminal para a continuación acoplarse a la proteína transportadora, como el solicitante mostró en otro modelo de antígeno conjugado en el documento mencionado anteriormente Porro M. et al. en *Molecular Immunology*, 23: 385-391, 1986.

- 35 Finalmente, se podría pensar que la construcción molecular descrita se prepara mediante glicosilación enzimática en células bacterianas o de levadura u otras células vivas modificadas por ingeniería genética, utilizando técnicas de ADN recombinante "ad hoc".

Ejemplo 2:

- 40 iii) *Síntesis del antígeno conjugado tetravalente que comprende LPS (lipopolisacáridos) de S. enteritidis, S. paratyphi A y S. dysenteriae con la proteína transportadora Citotoxoide B;*

iv) *Síntesis del antígeno conjugado tetravalente que comprende LPS (lipopolisacáridos) de S. enteritidis, S. paratyphi A y S. dysenteriae con la proteína transportadora Enterotoxoide A.*

Activación química de los tres LPS a los derivados de LPS-DAB (derivado de ácido diaminobutírico) homólogos

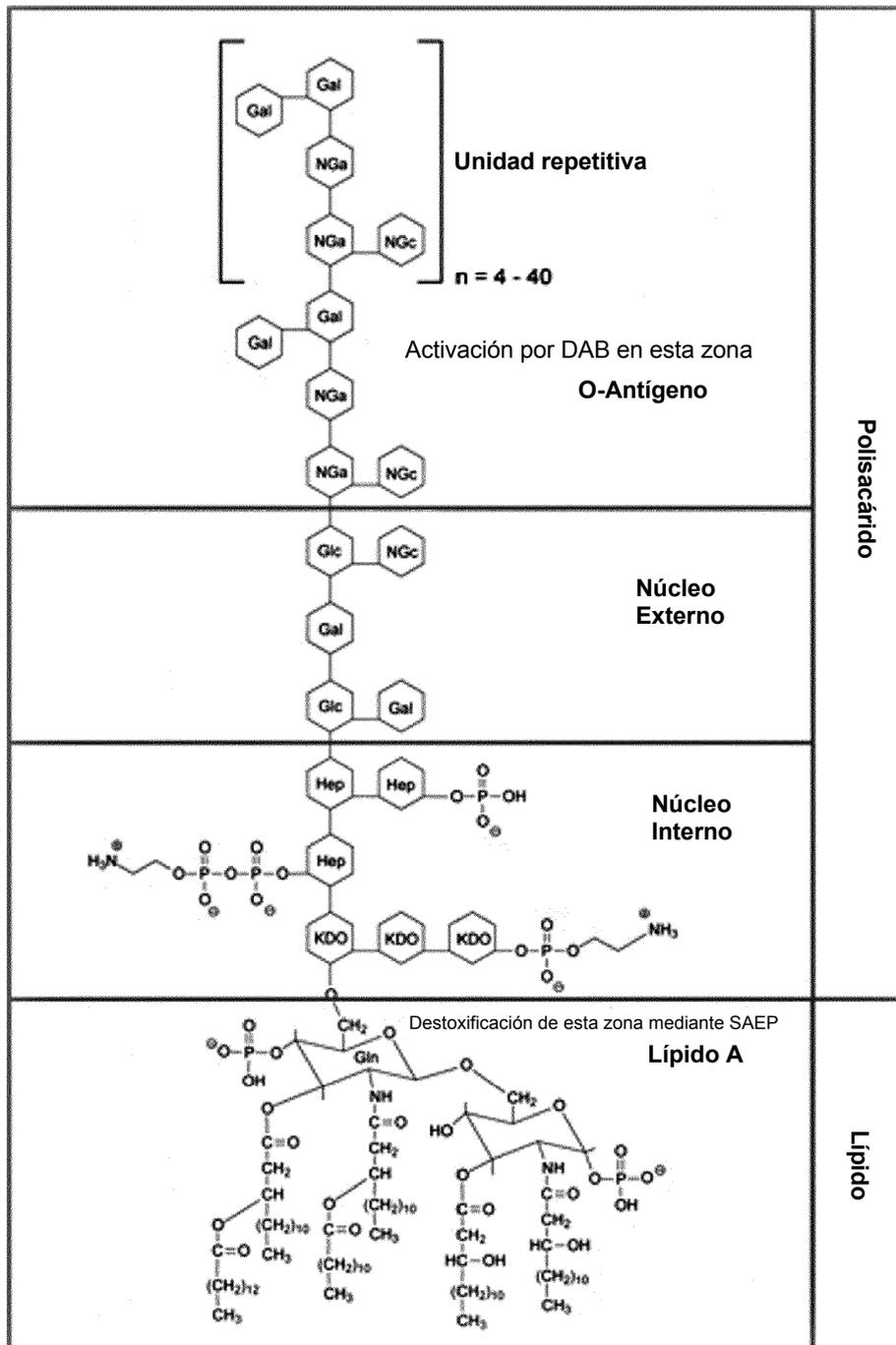
- 45 Los tres LPS se modificaron químicamente en su radical de carbohidrato O-antígeno para formar los derivados de DAB correspondientes (véase el esquema siguiente que muestra la zona activada por DAB dentro del radical carbohidrato de O-antígeno que es la parte más hidrófila de la molécula de LPS). La estructura "central" es difícil de activar porque está muy cerca de la zona hidrófoba (Lípido A), que es una estructura bastante críptica responsable de la estructura de tipo micela de los LPS, que también es responsable de la toxicidad biológica de los LPS (p.ej., inflamación local y sistémica, mediada por TNF e IL6, seguida de pirogenicidad) así como para la expresión óptima de la antigenicidad y la inmunogenicidad. En una realización preferida de la presente solicitud, la toxicidad biológica de los LPS se bloquea selectivamente a continuación a través de la unión de alta afinidad con SAEP, que conserva tales características óptimas de los LPS unidos a su estructura supramolecular de tipo micela.

- 55 La etapa de activación de DAB se ha realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por el solicitante en la reivindicación 1 (etapa A1) de la patente mencionada anteriormente EP1501542. Se han realizado controles

específicos de dicha activación, así como las características obtenidas de las estructuras de Ps activadas utilizando Espectroscopía RMN H^1 como se informa en la solicitud de patente internacional Núm. PCT/EP2014/051670.

El análisis de RMN H^1 en los derivados de DAB se realizó como se describió anteriormente para el Ejemplo 1.

- 5 El siguiente esquema representa la estructura general de LPS de Enterobacteriaceae con los sitios localizados de activación por DAB (necesarios para la conjugación con la proteína transportadora) y la destoxificación biológica necesaria, preferentemente realizada por SAEP (Péptido sintético antiendotoxina), que permite lograr la destoxificación, a la vez que los LPS conservan su estructura antigénica supramolecular, tipo micela).

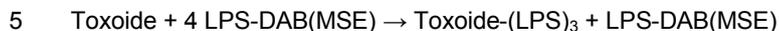


- 10 **Derivatización de LPS de *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* y *S. dysenteriae* a sus ésteres activos homólogos como derivados de LPS-DAB-MSE**

Esta etapa se ha realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por el solicitante en la Reivindicación 8 de la Patente Europea EP 1501542.

Acoplamiento simultáneo de los tres LPS activados (poli-funcionales) a la proteína transportadora (poli-funcional) Enterotoxide A

La ecuación química referida anteriormente en el Ejemplo 1, también se aplica a los productos conjugados de Toxoides y derivados de LPS:



De manera que:

$$K_{eq} = \frac{[\text{Toxide} - (\text{LPS})_3][\text{LPS} - \text{DAB(MSE)}]}{[\text{Toxide}][\text{LPS} - \text{DAB(MSE)}]^4} = \frac{[\text{Toxide} - (\text{LPS})_3]}{[\text{Toxide}][\text{LPS} - \text{DAB(MSE)}]^3}$$

10 La ecuación se refiere a la concentración de los ésteres activos totales (MSE) que derivan de la suma de partes iguales de los antígenos LPS activados por DAB, que a su vez son comparables con la cantidad del conector DAB cuantificado por Espectrometría de RMN H^1 que está presente en cada antígeno LPS activado (tasa de conversión de Ps-DAB en Ps-DAB (MSE) $\geq 98\%$ sobre una base molar).

15 La síntesis química del producto conjugado, también conocida como reacción de acoplamiento, se ha realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por el solicitante en la reivindicación 8 de la Patente Europea EP1501542. Se puede considerar aquí, sin embargo, que el procedimiento es innovador puesto que las tres reacciones de acoplamiento se ejecutan simultáneamente, en lugar de proceder en una reacción de acoplamiento en el momento (o procedimiento paso a paso). Este procedimiento puede preferirse al acoplamiento paso a paso de cada antígeno activado por Ps por la sencilla razón de que se acorta el tiempo de reacción, mejorando por lo tanto la eficacia de la reacción, siempre que los tres Ps activados estén en condiciones de competir comparativamente en el equilibrio de la reacción de acoplamiento (esta característica incluye MW promedio comparable, intervalo de activación de LPS-DAB comparable y razones estequiométricas comparables entre los grupos reaccionantes de la proteína y los del LPS activado). Las construcciones moleculares obtenidas de esta manera, sin embargo, resultan ser tóxicas debido a que el radical Lípido A del LPS está activamente presente en la estructura molecular. Con el fin de perseguir y lograr el uso seguro de la entidad conjugada Toxide-LPS, la estructura de LPS debe someterse a la destoxificación alternativamente a través de la escisión del radical de Lípido A, o por saturación del sitio de unión de Lípido A a través de una estrategia específica que utiliza la Péptidos Sintéticos Anti-Endotoxina (SAEP). Esta última es la realización preferida en el contexto de la presente invención (véase el siguiente ejemplo 3).

Ejemplo 3: *Preparación de productos conjugados de Enterotoxide A-Endotoxide y productos conjugados de Citotoxide B-Endotoxides a partir de sus productos conjugados homólogos de Enterotoxide A-LPS (Endotoxina, Citotoxide B-LPS (Endotoxina)*

30 Los endotoxoides son antígenos no tóxicos capaces de inducir actividad inmunológica específica contra sus LPS homólogos que son los principales antígenos tóxicos nativos expuestos en la superficie de la bacteria Gram (-).

Un libro de texto completo, públicamente disponible, que es exhaustivo sobre los muchos aspectos científicos de los antígenos de endotoxinas que se originan de bacterias Gram-negativas es "Endotoxins" por Kevin L. Williams, Editor, Informa Health Care USA Inc., editorial, Nueva York (2007).

35 Un endotoxide es una entidad molecular compuesta de un complejo equimolar de SAEP, péptidos sintéticos anti-endotoxina, con el radical de lípido A de LPS (Endotoxina):



40 Un endotoxide, que se origina a partir de una endotoxina (lipopolisacárido) específica de la especie dada (inmunotipo), se prepara de acuerdo con el concepto científico referido por Rustici et al. (Science 259: 361-365, 1993) y en los detalles moleculares previamente descritos referidos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.951.652 y en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.507.718.

45 La actividad inmunológica de un Endotoxide implica anticuerpos policlonales de los isotipos IgG (principalmente) e IgM que tienen actividad biológica (efecto bactericida) a través del mecanismo conocido en inmunología como opsonofagocitosis (OP, o englobamiento mediado por anticuerpos de bacterias en macrófagos y PMC) y Bactericida Directo (DB, lisis mediada por anticuerpos de la pared celular bacteriana), estando mediados ambos mecanismos por la activación de la ruta del complemento.

50 Los endotoxoides son antígenos dependientes de células T coadyuvantes en modelos animales pero aún no se han experimentado en bebés humanos, donde el sistema inmunitario no está completamente desarrollado hasta una edad superior a los 2 años. Por esta razón, se ha considerado en la presente solicitud la conjugación a las proteínas transportadoras dependientes de células T coadyuvantes como los dos Toxoides proteicos referidos anteriormente de *C. difficile* para la preparación del producto de vacuna deseado.

En consecuencia, los productos conjugados de Enterotoxide A o Citotoxide B con LPS (endotoxina) específicos de especie seleccionados se han hecho reaccionar con SAEP2 (Rustici et al., *Science* 259: 361-365, 1993) en las condiciones generalmente referidas en Patente de Estados Unidos Núm. 7.507.718 (véanse las páginas 33-34 y la reivindicación 17), para lograr la destoxificación del LPS conjugado con Toxide de manera que se formen los

5

Se han preparado los siguientes Endotoxoides conjugados con Toxide:

Enterotoxide A conjugado covalentemente con endotoxoides de *S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis*;

Citotoxide B conjugado covalentemente con Endotoxoides de *S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis*;

10

CRM197 conjugado covalentemente con endotoxoides de *S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis* como proteína transportadora dependiente de células T coadyuvantes bien establecida, útil para controlar los experimentos de inmunización en modelos animales.

15

Ejemplo 4: *Combinación del antígeno conjugado tetravalente que comprende polisacáridos de S. typhi (Vi), E. coli (K1) y V. cholerae (0139) conjugados con la proteína transportadora Enterotoxide A, comprendiendo el antígeno conjugado tetravalente LPS/Endotoxoides de S. enteritidis, S. paratyphi A y S. dysenteriae conjugados con la proteína transportadora Citotoxide B.*

La combinación se prepara asociando los dos tipos de modelos moleculares a la dosis apropiada para los estudios inmunogénicos en los modelos animales descritos a continuación en el Ejemplo 8.

20

Ejemplo 5: *Análisis físico-químico de la construcción molecular multivalente antigénica que comprende los polisacáridos de S. typhi (Vi), E. coli (K1) y V. cholerae (0139) conjugados con la proteína transportadora Enterotoxide A o Citotoxide B.*

El análisis de GPC (cromatografía de penetración en gel) sobre Sepharose 4B-CL se ha utilizado para realizar el análisis físico de la construcción molecular multivalente antigénica del Ejemplo 1. La purificación del antígeno multivalente de alto peso molecular (HMW) se obtiene simplemente mediante la recolección y agrupación las fracciones eluidas de $K_d = 0,00$ a $K_d = 0,30$.

25

Los polímeros de la unidad básica de la construcción molecular se obtienen como entidades moleculares entrecruzadas debido a la polifuncionalidad de los antígenos Ps (aproximadamente 2% de activación por DAB, sobre una base molar, como se evidencia mediante espectroscopía de RMN H^1) y la polifuncionalidad de la proteína transportadora (aproximadamente 104 grupos amino reactivos/mol de Toxide A, determinado por la reacción de TNBS, restantes de los 223 residuos de Lys nativos de la Toxina A + 1 AA amino terminal, dentro de la estructura que abarca los 2.710 AA totales de la secuencia, aproximadamente 85 grupos amino reactivos/mol de Toxide B, determinado por la reacción de TNBS, restantes de los 156 residuos de Lys nativos de la toxina B + 1 AA amino terminal, dentro de la estructura que abarca los 2.366 AA totales de la secuencia).

30

A la luz de lo anterior, el producto conjugado bajo análisis aparece como una entidad molecular de monomérica a polimérica, polidispersa que contiene la unidad básica de la construcción molecular referida en la ecuación química, con un HMW que deriva de la unidad polimerizada básica que abarca el Enterotoxide A ($MW = 3,08 \times 10^5$) o el Citotoxide B ($MW = 2,70 \times 10^5$) y un promedio de $MW = 10^5$ para cada uno de los tres antígenos Ps/LPS (o un total de aproximadamente $3,0 \times 10^5$) lo que da como resultado un MW promedio global de $6,10 \times 10^5$ por unidad básica; en consecuencia, las diversas unidades entrecruzadas de tal estructura básica alcanzan varios millones y se eluyen principalmente en V_0 de la columna Sepharose 4B-CL.

35

40

La razón p/p entre la proteína transportadora y cada uno de los tres Ps específicos de tipo es aprox. 3,6 (Tabla 1, más abajo); esta razón p/p produce una razón molar promedio (R) de proteína/Ps específico de tipo de aprox. 1,0, correspondiente a una razón promedio de un mol de proteína/mol de Ps específico de tipo, como también sugiere la ecuación química. En consecuencia, la entidad molecular entrecruzada obtenida experimentalmente responde a un modelo molecular constituido por varias unidades poliméricas de la unidad básica que consiste simplemente en un

45

Ejemplo 6: *Análisis inmunoquímico de la construcción molecular multivalente antigénica de Enterotoxide A-PsVi, PsK1, Ps0139 o Citotoxide B-PsVi, PsK1, Ps0139*

50

La construcción molecular purificada por GPC se analizó mediante ELISA de inhibición para determinar la especificidad serológica de los cuatro anticuerpos policlonales de suero diferentes (PAb) y para determinar la presencia cualitativa y cuantitativa de cada antígeno de la construcción, como se describe en la solicitud de patente internacional. PCT/EP2014/051670.

La comparación entre la titulación química y la titulación inmunoquímica de antígenos de carbohidratos para someter a ensayo su equivalencia cuantitativa, se realizó mediante el uso de ELISA de inhibición, a través del parámetro

CIM₅₀ (Concentración Inhibidora Mínima del antígeno de carbohidrato seleccionado que actúa como inhibidor de la reacción Ps-Ab de referencia homóloga) determinado experimentalmente con el fin de evaluar y correlacionar la exactitud y precisión del método inmunoquímico con respecto al químico en el control analítico de dicho tipo de construcción molecular.

5 **Ejemplo 7:** *Determinación de la concentración para el antígeno de carbohidrato en forma conjugada activada o multivalente: comparación de titulación química vs. titulación inmunoquímica*

10 Los títulos inmunoquímicos se obtienen de acuerdo con el método referido anteriormente con respecto al ELISA de Inhibición en comparación con los títulos químicos obtenidos de acuerdo con los métodos referidos en las secciones específicas de la solicitud internacional de patente PCT/EP2014/051670; los títulos inmunoquímicos de muestras desconocidas de cada uno de los tres antígenos específicos de carbohidratos, ya sea en forma activada o conjugada, se determinaron mediante interpolación en la parte lineal de una curva patrón de referencia construida mediante ELISA de inhibición utilizando la cantidad de antígeno de carbohidrato titulada químicamente conocida.

15 La misma metodología descrita para el análisis inmunoquímico cualitativo y cuantitativo de cada construcción molecular descrita anteriormente, se utiliza a continuación para la caracterización de la formulación final de la vacuna polivalente que contiene la asociación de las dos construcciones moleculares, cada una constituida por una tríada de productos conjugados de Ps/LPS (endotoxoides) de los dos Toxoides de *C. difficile* utilizados como proteínas transportadoras, para obtener la caracterización completa de una vacuna 4-valente u 8-valente ilustrativa.

15 **Ejemplo 8:** *Formulación de vacuna relacionada con la estequiometría de las construcciones moleculares multivalentes*

20 Tal clase de formulaciones de amplio espectro para una vacuna entérica se puede preparar de manera segura mediante el uso de construcciones moleculares de la presente invención, que permite un uso reducido de un portador de proteína para transportar tal número de antígenos Ps y LPS (Endotoxoides) conjugados. Puesto que se refiere específicamente a una formulación ilustrada de una Vacuna Entérica que contiene una formulación 8-valente que incluye los Ps y LPS/(Endotoxoides) más prevalentes, epidemiológicamente significativos, las siguientes construcciones moleculares (Tabla 1) se han sintetizado y analizado como una ilustración ampliada de las realizaciones preferidas, de acuerdo con los métodos presentados anteriormente en los diversos Ejemplos que detallan las construcciones moleculares basadas en Enterotoxide A y Citotoxide B que portan Ps/LPS (Endotoxoides), así como la combinación de los dos.

30 La cantidad total de los dos Toxoides de proteína transportadora ilustrados en esta vacuna entérica 8- valente preparada y formulada de acuerdo con los procedimientos referidos en esta solicitud y definida por la estequiometría de las construcciones moleculares resultantes, expresando cada una epítomos múltiples incorporados, es coherente con la siguiente composición molar con respecto a la dosis de cada construcción molecular que contiene aprox. 1 µg de cada uno de los dos toxoides de la proteína transportadora (MW = 308K y 270K, respectivamente) y aprox. 0,3 µg de cada uno de los tres antígenos Ps/LPS (endotoxoides) específicos de tipo, activados por DAB, seleccionados (MW promedio = 100K basado en dos criterios de análisis diferentes, es decir, estimación del tamaño promedio por filtración molecular en membranas filtrantes calibradas y estimación del tamaño mediante GPC, en todos los casos utilizando moléculas de carbohidrato de referencia como Dextranos de varios MW).

Tabla 1

Construcción molecular	Razón en peso promedio Toxide/Ps	Razón molar promedio Toxide/Ps
EnteroTox A para:		
Ps <i>E. coli</i>	3,30	1,08
Ps <i>S. typhi</i>	3,80	1,24
Ps <i>V. cholerae</i>	4,05	1,33
CitoTox B para:		
EndoTox <i>S. enteritidis</i>	3,65	1,36
EndoTox <i>S. paratyphi A</i>	3,01	1,12

Construcción molecular	Razón en peso promedio Toxoide/Ps	Razón molar promedio Toxoide/Ps
EndoTox <i>S. dysenteriae</i>	3,90	1,45

En las construcciones moleculares ilustradas, la media de la razón (p/p) de proteína a Ps/LPS es: $3,61 \pm 0,39$ (10,8%) correspondiente a la media de la razón (mol/mol): $1,26 \pm 0,14$ (11,1%).

5 El concepto de calcular y comparar las características de los antígenos conjugados sobre una base molar es fundamental porque el sistema inmunitario procesa antígenos sobre una base molar, como lo hace la Naturaleza en cada reacción química o bioquímica de transformación de materia, por lo tanto, se refiere al MW del antígeno.

10 Por consiguiente, dependiendo del MW promedio de cada antígeno Ps/LPS específico de tipo y del de los toxoides portadores de proteína, las razones molares de los antígenos conjugados están sujetas a cambios mediante la selección de sus componentes antigénicos. Se prefiere principalmente que las razones molares entre la proteína transportadora y cada antígeno Ps específico de tipo sea igual o mayor que 1,0 para una expresión óptima probable de dependencia de células T coadyuvantes. Además de este parámetro molar, también es importante considerar la cantidad promedio de enlaces covalentes interpuestos entre la proteína y cada antígeno de carbohidrato específico de tipo, que es paralela a la tasa de activación del polisacárido específico de tipo, ya que esta región molecular híbrida es la sugerida experimentalmente como responsable de las propiedades dependientes de células T coadyuvantes adquiridas de una molécula conjugada (Arndt y Porro, 1991).

15 Sin embargo, es posible sintetizar las construcciones moleculares de acuerdo con diferentes estequiometrías de síntesis, tal como se detalla en la solicitud de patente internacional PCT/EP2014/051670, abordando la cantidad de reactivos que participan en el equilibrio químico referido en la ecuación química anterior, que puede conducir a una construcción molecular de diferente estequiometría, donde la cantidad de proteína transportadora dependiente de celular T coadyuvantes en la construcción molecular puede seleccionarse óptimamente de acuerdo con la expresión óptima de la inmunogenicidad de tal construcción molecular en los diversos grupos de edad de la población humana. En ambos, las formulaciones, 4-valentes a 8-valentes, arriba mencionadas, que contienen de una a dos construcciones moleculares que portan cada una tres PS/LPS específicos del tipo, la cantidad total de cada proteína transportadora Toxoide es aprox. 1 μg , mientras que el Ps/LPS específico de tipo conjugado (Endotoxoide) está en la cantidad de aprox. 0,3 μg , respectivamente.

20 De acuerdo con esto, el propósito de las realizaciones descritas anteriormente es proporcionar evidencia del hecho de que la construcción molecular antigénica multivalente descrita con epítomos incorporados se puede sintetizar en una amplia gama de parámetros estequiométricos con el fin de definir adecuadamente, en mamíferos anfitriones y particularmente en seres humanos, la dosis óptima de la construcción incluso cuando se consideran los diferentes grupos de edad (desde bebés hasta ancianos) que van a ser inmunizados por tal formulación de vacuna de amplio espectro.

25 La Tabla 2 a continuación, muestra diferentes modelos moleculares obtenidos para el concepto anterior, haciendo uso de la misma reacción química de síntesis, aunque utilizando diferentes estequiometrías elegidas "ad hoc" para los reactivos que participan en el equilibrio.

30 A continuación, se informa sobre algunas consideraciones sobre los dos toxoides utilizados en la presente solicitud, Enterotoxoide A y Citotoxoide B, ya que son (o pueden ser) derivados tratados químicamente de las Toxinas homólogas. Este procedimiento histórico, utilizado para vacunas históricas como el Toxoide tetánico y el Toxoide diftérico, es necesario para que las toxinas se destoxifiquen a propósito para un uso humano seguro como inmunógenos. En la presente Solicitud, los autores de la presente invención han considerado que el MW promedio de los Toxoides purificados es comparable al de las Toxinas de las que derivan.

35 Sin embargo, entre otras características, la marcada diferencia entre Toxoides y Toxinas reside en la cantidad de grupos amino primarios residuales de los residuos de Lisina que permanecen en las estructuras de los Toxoides después de la destoxificación química. Está a punto de detectarse un promedio de 47% a 54% de grupos amino reactivos en los Toxoides con respecto a los originalmente presentes en la estructura de las Toxinas homólogas, que funcionan como grupos nucleófilos en la reacción de acoplamiento con los antígenos Ps/LPS activados. Al comparar la estructura de los dos Toxoides con la de una proteína transportadora consolidada e histórica como CRM197, en términos de capacidad para competir en la reacción de acoplamiento como reactivo nucleófilo, se puede determinar que el Toxoide A tiene aprox. 104 grupos amino/mol (MW = $3,08 \times 10^5$ para 2.710 AA) mientras que el Toxoide B tiene aprox. 85 grupos amino/mol (MW = $2,7 \times 10^5$ para 2.366 AA), de modo que la densidad molar de los mismos (que los autores de la presente invención definen como "actividad nucleófila molar") es 3,84% en el Enterotoxoide A y 3,60% en el Citotoxoide B, dos parámetros que son significativamente menores que el calculado para CRM197 (7,47%) que tiene una mayor capacidad para servir como reactivo nucleófilo en una reacción de acoplamiento dada (como se detalla en la solicitud de patente internacional Núm. PCT/EP2014/051670). Sin embargo, dada la diferencia significativa en el MW de los dos toxoides de proteína (básicamente un factor = 5,3 y 4,7 a su favor con respecto a

CRM197) las razones molares del portador de proteína, para cada uno de los antígenos de carbohidratos transportados seleccionados en las construcciones moleculares, pueden resultar ventajosas para los Toxoides cuando se está dispuesto a limitar la cantidad de proteína transportadora/dosis en una formulación polivalente. De hecho, a dosis de peso comparables de los dos Toxoides de proteína transportadora, resultan ser aproximadamente 5,0 veces menores que CRM197 sobre una base molar. Por consiguiente, se debe prestar atención al hecho de que el MW del portador es un parámetro importante que afecta las características físico-químicas de los productos conjugados y puede limitar la posibilidad de obtener una razón molar de Toxoide/Ps/LPS específico con un valor $\geq 1,0$ para la óptima inducción de dependencia de células T coadyuvantes en el sistema inmunitario del anfitrión.

La Tabla 2 enumera todos los modelos moleculares sintetizados para el trabajo detallado en la presente Solicitud, representativos de las diversas estequiometrías utilizadas para este fin, que dependen de: i) el MW de la proteína transportadora utilizada; ii) la actividad nucleófila molar de tales proteínas transportadoras (que expresa la cantidad de grupos $-NH_2$ /mol de proteína); iii) el MW promedio de los antígenos Ps/LPS activados y, iv) la tasa de activación respectiva de los antígenos Ps/LPS (grupos DAB-MSE para después reaccionar con los grupos $-NH_2$ de la proteína). Los modelos moleculares ilustrados evidencian la flexibilidad de la química adoptada y el hecho de que la proteína transportadora puede estar presente en la entidad conjugada a una amplia variedad de razones molares y ponderales, por encima de 1,0 y por debajo de 1,0. En particular, la razón molar de Proteína/Ps varió de al menos 0,3 a 1,0 al considerar cada Ps específico de tipo o específico de grupo presente en el producto glicoconjugado, y de al menos 0,3 a 1,0 cuando se consideró el total de los tres Ps, contribuyendo cada Ps en aproximadamente un tercio a la cantidad total finalmente presente en el producto glicoconjugado.

Tabla 2

Construcción molecular	Razón en peso promedio Toxoide/Ps	Razón molar promedio Toxoide/Ps
<u>EnteroTox A para:</u>		
Ps <i>E. coli</i>	3,30	1,08
Ps <i>S. typhi</i>	3,80	1,24
Ps <i>V. cholerae</i>	4,05	1,33
Ps <i>E. coli</i>	1,05	0,34
Ps <i>S. typhi</i>	1,15	0,37
Ps <i>V. cholerae</i>	1,03	0,33
EndoTox <i>S. enteritidis</i>	3,35	1,09
EndoTox <i>S. paratyphi A</i>	3,00	0,97
EndoTox <i>S. dysenteriae</i>	3,20	1,04
EndoTox <i>S. enteritidis</i>	1,13	0,37
EndoTox <i>S. paratyphi A</i>	1,20	0,39
EndoTox <i>S. dysenteriae</i>	1,05	0,34

<u>CitoTox B para:</u>		
EndoTox <i>S. enteritidis</i>	3,65	1,36
EndoTox <i>S. paratyphi A</i>	3,01	1,12
EndoTox <i>S. dysenteriae</i>	3,90	1,45
EndoTox <i>S. enteritidis</i>	1,23	0,46
EndoTox <i>S. paratyphi A</i>	1,02	0,38
EndoTox <i>S. dysenteriae</i>	1,15	0,43
Ps <i>E. coli</i>	3,60	1,33
Ps <i>S. typhi</i>	3,45	1,28
Ps <i>V. cholerae</i>	3,85	1,43
Ps <i>E. coli</i>	1,25	0,46
Ps <i>S. typhi</i>	1,10	0,40
Ps <i>V. cholerae</i>	1,43	0,53

Ejemplo 9: Análisis inmunológico en modelos animales de las construcciones moleculares multivalentes antigénicas de Enterotoxide A y Citotoxide B (que se originan a partir de las toxinas homólogas de *C. difficile*) que portan polisacáridos (*S. typhi*, *V. cholerae*, *E. coli*) o LPS/ Endotoxoides (*S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis*)

- 5 Los dos tipos de productos conjugados que utilizan las dos proteínas Toxoides de *C. difficile*, se han sometido a experimentación en un modelo animal murino para experimentos de inmunización activa. Como inmunógeno de control dependiente de células T coadyuvantes, se utilizaron en experimentos paralelos los productos conjugados homólogos de CRM197.

Formulación de vacuna para productos conjugados de Ps

- 10 Se combinaron productos conjugados de Enterotoxide A y Citotoxide B de PsVi, Ps0139 y PsK1. Las características estequiométricas de los productos conjugados mostraron una razón media de Proteína/cada uno de los Ps específicos de tipo de $3,61 \pm 0,39$ (p/p) como se muestra en la Tabla 1 anterior.

Formulación de vacunas para productos conjugados de LPS/Endotoxoides

- 15 Se combinaron productos conjugados de Enterotoxide A y Citotoxide B de LPS de *S. enteritidis*, *S. dysenteriae* y *S. paratyphi A*. Las características estequiométricas de los productos conjugados mostraron una razón media de proteína/cada uno de los LPS específicos de tipo/Endotoxide de $3,61 \pm 0,39$ (p/p) como se muestra en la Tabla 1 anterior.

Formulación combinada de vacuna entérica de amplio espectro para productos conjugados de Ps y productos conjugados de LPS (endotoxoides) utilizando las proteínas transportadoras Enterotoxide A y Citotoxide B

- 20 Se combinaron para este fin productos conjugados de Enterotoxide A de PsVi, Ps0139 y PsK1 y productos conjugados de Citotoxide B de LPS (endotoxoides) de *S. enteritidis*, *S. dysenteriae* y *S. paratyphi A*.

Dosis y formulaciones de las vacunas ilustrativas

De acuerdo con la estequiometría de las construcciones moleculares referidas anteriormente en la Tabla 1, la dosis inyectada es de aprox. 1,0 µg por cada Ps/LPS (Endotoxide) conjugado presente en cada construcción molecular y para cada Toxide (aproximadamente 3,0 µg) contenido en la Formulación de Vacuna; la dosis se convierte en aprox. 6,0 µg de la cantidad de proteína total cuando la Formulación de Vacuna contiene los Toxoides combinados para la misma tríada o tríadas diferentes de antígenos Ps/LPS (endotoxoides) transportados (vacuna de amplio espectro); AlPO₄ se usa como coadyuvante a la dosis fija de 0,5 mg/dosis (equivalente a aproximadamente 0,120 mg de alum). La adsorción de cada construcción molecular multivalente al coadyuvante mineral se produjo a ≥ 80%, en peso, como se estimó mediante ELISA de inhibición.

10 Animales

Cada grupo de animales seleccionado para cada uno de los experimentos de inmunización descritos a continuación contenía 10 ratones hembra Balb/c.

Ruta

i.p.

15 Programa de Inmunización

0, 2, 4 semanas; toma de muestras de sangre durante la semana 0, 2, 4, 6.

La inmunización de control con antígenos Ps simples se omitió basándose en el conocimiento histórico de que los antígenos Ps altamente purificados no son significativamente inmunogénicos en mamíferos y no "estimulan" anticuerpos isotipo IgG después de inyecciones repetidas de los mismos.

20 Títulos de ELISA

Títulos expresados como reacción de punto final mostrando D.O. ≥ 2,0 con respecto a las reacciones de control para cada Ps/LPS específico de tipo (Endotoxide) y las dos proteínas Toxoides. Las diluciones del conjunto de Sueros se realizan en serie, en dos modalidades, a partir de la dilución 1/200.

Resultados inmunológicos

25 Títulos medios geométricos de IgG para Ps/LPS específicos (Endotoxide) o para cada uno de los dos Toxoides, en el conjunto de sueros murinos, según se determina mediante ELISA. La DT está dentro del ± 25% de la Media Geométrica referida. A menos que se indique lo contrario, la significación estadística entre los títulos de los sueros (determinada por la prueba t) fue <0,01. Los resultados se resumen en las siguientes Tablas 3 y 4.

Neutralización in vitro de las toxinas homólogas

30 Realizada de acuerdo con lo referido por Porro et al. (1980) para la Toxina de la Difteria y por Pavliakova et al. (2000) para las Toxinas de *C. difficile*.

La Tabla 3 ilustra la inmunorrespuesta de ratones al modelo molecular que implica Enterotoxide A y Citotoxide B como proteína transportadora para antígenos Ps de *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhi*.

Tabla 3

Ps	Enterotoxide A				Citotoxide B			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
Vi	<200	200	2.600	15.800	<200	200	2.200	18.900
K1	<200	200	3.200	12.400	<200	200	2.400	20.000
0139	<200	200	1.800	11.600	<200	200	1.200	14.800
Tox	<200	2.800	25.800	84.400	<200	3.200	32.600	95.400

35 La Tabla 4 muestra la inmunorrespuesta de ratones al modelo molecular que implica Enterotoxide A y Citotoxide B como portador de antígenos LPS/Endotoxoides de *S. enteritidis*, *S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*.

Tabla 4

LPS (Endotoxide)	Enterotoxide A				Citotoxide B			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
S. enteritidis	<200	400	3.600	12.800	<200	200	1.800	10.400
S. paratyphi A	<200	200	2.400	14.800	<200	400	3.600	16.400
S. dysenteriae	<200	200	2.200	16.400	<200	400	2.800	14.200
Toxide	<200	3.400	28.200	66.400	<200	2.400	24.800	84.200

5 Los resultados representados en las Tablas 3 y 4 anteriores muestran la inducción anamnésica de anticuerpos de isotipo IgG biológicamente funcionales para cada uno de los cuatro componentes de las dos construcciones moleculares multivalentes (productos conjugados multivalentes de Toxide-Ps y Toxide-Endotoxide).

10 Particularmente, se observa en paralelo cualquier actividad potenciadora sobre el sistema inmunitario observada para la proteína transportadora para cada uno de los antígenos Ps transportados, comportamiento típico y bien conocido de antígenos dependientes de células T coadyuvantes. El efecto de refuerzo obtenido contra los dos toxoides y la actividad biológica de los anticuerpos anti-toxide inducidos también respalda fuertemente el hecho de que la construcción molecular multivalente tiene el potencial de funcionar como antígeno en seres humanos para la prevención de la toxicidad debida a las toxinas homólogas. Se recogieron los siguientes resultados, expresados como multiplicidad de aumento con respecto a los títulos de preinmunización, de los sueros GMT obtenidos después de la segunda dosis de refuerzo y referidos en la siguiente Tabla 5 como títulos antitóxicos.

Tabla 5

Toxide	Ab contra la toxina homóloga (multiplicidad de aumento para la neutralización de la toxina, <i>in vitro</i>)
Enterotoxide A	456
Citotoxide B	562
CRM 197	824

15 Los resultados detallados anteriormente, aunque solo se centran en algunos ejemplos específicos, respaldan la preparación y el uso de una vacuna entérica de amplio espectro para inducir inmunidad en un anfitrión mamífero contra las proteínas transportadoras Enterotoxide A y Citotoxide B de *C. difficile* así como también contra los Ps transportados de *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhi* y los Endotoxoides transportados de *S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis*. Basándose en lo anterior, los Ps capsulares de *C. difficile* también se pueden considerar antígenos Ps transportados por los dos toxoides del patógeno homólogo, de acuerdo con la construcción molecular detallada.

20 La formulación de una vacuna de amplio espectro como la anterior descrita en los Ejemplos 8 y 9 tiene ventajas objetivas en una formulación de vacuna que considera la asociación simple y eventual de cada uno de los seis productos conjugados de Ps/LPS (Endotoxoides) diferentes de cada uno de las dos proteínas toxoides:

25 A) al utilizar el modelo molecular con múltiples epítomos incorporados, se puede reducir realmente la cantidad de proteína transportadora presente en la formulación de amplio espectro (p.ej.: el uso de solo dos tríadas de productos conjugados reduce la cantidad de proteína transportadora a 1/3 o 33% de la cantidad de proteína transportadora presente en la formulación asociada de los seis productos conjugados);

30 B) el número de inyecciones se reduciría a un total de 3 inyecciones con un evidente ahorro de materiales y recursos, además de la menor tensión del anfitrión mamífero involucrado (un mínimo de 3 inyecciones, una dosis de sensibilización y dos dosis de refuerzo, para cada una de las seis vacunas individuales específicas de tipo daría como resultado un total de 18 inyecciones).

BIBLIOGRAFÍA

- Arndt y Porro, Immunobiology of Proteins and Peptides, editado por M.Z. Atassi, Plenum Press, Nueva York y Londres, páginas 129-148, 1991.
- Chan M. et al. Scientific reports (www.nature.com), DOI 10.1038/srep11507 del 17 de junio, 2015.
- 5 - Dagan R. et al. Vaccine, 28: 5513-5523 (2010)
- Donald R. et al. Microbiology, 159: 1254-1266, 2013.
- Endotoxinas. Kevin L. Williams, Editor, Informa Health Care USA Inc., editor, Nueva York, 2007.
- Patente Europea EP 1.501.542.
- Patente de Estados Unidos Núm. 6.951.652.
- 10 - Patente de Estados Unidos Núm. 7.507.718.
- Jones M.K. et al., Science, 346: 755-759, 2014.
- Lee L.H. y Blake M.S., Clinical and Vaccine Immunol., Pág. 551-556 (2012)
- Libby J.M. et al., Infect. Immun. 36: 822-829, 1982.
- Lindesmith LC et al., (2015), PLoS Med 12 (3): e1001807.doi: 10.1371/journal.pmed.1001807
- 15 - Livery D.M. et al., Infect. Immun. 47: 349-352, 1985.
- Lowy I. et al., New England J. Med. 362: 197-205, 2010.
- Pavliakova D. et al., Infect. Immun., 68: 2161-2166, 2000.
- Solicitud de patente internacional WO2004/052394 A1.
- Solicitud de patente internacional Núm. PCT/EP2014/051670.
- 20 - Porro M. et al. Molecular Immunology, 23: 385-391, 1986.
- Porro M. et al. J. Infect. Dis., 142: 716-724, 1980
- Romano M. et al., Toxins, 6: 1385-1396, 2014.
- Rupnick M. et al., Nat Rev Microbiol. 7 (7): 526-536, 2009.
- Rustici A. et al., Science 259: 361-365, 1993.
- 25 - Salcedo J. et al., Gut, 41: 366-370-1997.
- Simor A.E. et al. Infection Control and Hospital Epidemiology, vol. 23, Núm. 11, 696-703, 2002.
- Sougioultzis S. et al., Gastroenterology, 128: 764 770, 2005.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción molecular multivalente antigénica que consiste en unidades básicas que comprenden las proteínas destoxificadas portadoras dependientes de células T coadyuvantes seleccionadas entre Enterotoxide A y Citotoxide B de *Clostridium difficile* unidas covalentemente a un mínimo de tres estructuras de carbohidrato de bacterias enteropatógenas seleccionadas entre polisacáridos bacterianos o lipopolisacáridos destoxificados de diferente especificidad serológica, en donde cada estructura de carbohidrato comprende al menos uno de los epítomos básicos repetitivos que consiste en un mínimo de cinco a doce residuos de monosacáridos, en donde al menos un mol de proteína transportadora se une a al menos un mol de cada una de las al menos tres estructuras de carbohidrato o su suma molar.
2. Una construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho Enterotoxide A o Citotoxide B procedente de *Clostridium difficile* se destoxifican mediante tratamiento con formalina o mediante tecnología de ADN recombinante.
3. Una construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 anteriores, en donde dichas estructuras de carbohidrato transportadas de diferente especificidad serológica se seleccionan entre polisacáridos capsulares de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Clostridium difficile* o una combinación de los mismos.
4. Una construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 anteriores, en donde dicho lipopolisacárido destoxificado es un Endotoxide.
5. Una construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4, en donde dichas estructuras de carbohidrato transportadas de diferente especificidad serológica se seleccionan entre lipopolisacáridos/endotoxoides destoxificados de bacterias enteropatógenas seleccionadas entre *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Shigella sonnei* y *Salmonella choleraesuis* o una combinación de los mismos.
6. Una construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, seleccionada entre:
- Enterotoxide A unido covalentemente a los polisacáridos capsulares de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*;
 - Citotoxide B unido covalentemente a los polisacáridos capsulares de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*;
 - Enterotoxide A unido covalentemente a los lipopolisacáridos/Endotoxoides destoxificados de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella dysenteriae*;
 - Citotoxide B unido covalentemente a los lipopolisacáridos/Endotoxoides destoxificados de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella dysenteriae*.
7. Una construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en una vacuna para la protección de un sujeto de las infecciones debidas a al menos una de las bacterias enteropatógenas seleccionadas entre *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* o una combinación de los mismos.
8. Una formulación de vacuna que comprende al menos una construcción molecular multivalente antigénica como se define de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en un vehículo fisiológicamente aceptable, opcionalmente junto con un coadyuvante o excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Una formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la dosis de cada antígeno transportador y/o antígenos transportados oscila entre 0,1 y 100 µg, siendo preferiblemente de 1 a 10 µg.
10. Una formulación de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde dicho coadyuvante se elige entre un coadyuvante mineral seleccionado entre fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio; un coadyuvante orgánico seleccionado entre coadyuvantes basados en escualeno tales como MF59, QF 21, Addavax y un coadyuvante biológico seleccionado entre monofosforil-lípido A y dicorinomicolato de trehalosa.
11. Una formulación de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la cantidad de coadyuvante oscila entre 0,1 - 1 mg/dosis, siendo preferiblemente de 0,5 mg/dosis.
12. Una formulación de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, siendo dicha formulación adecuada para la administración por vía subcutánea, intramuscular, intracutánea o transcutánea.

13. Una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12 anteriores, para su uso en el campo médico humano o veterinario para la protección de un sujeto de las infecciones sistémicas y entéricas debidas a al menos una de las bacterias enteropatógenas seleccionadas entre *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter* o una combinación de los mismos
14. Una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro para su uso en el campo médico humano o veterinario de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho sujeto pertenece a la población humana.
15. Una formulación de vacuna polivalente de amplio espectro para uso en el campo médico de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en la prevención y/o tratamiento de infecciones virales gastrointestinales debidas a norovirus humanos.
16. Un procedimiento de conjugación para preparar la construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende las siguientes etapas:
- a) activación química de al menos tres estructuras de carbohidrato antigénicamente diferentes seleccionadas entre:
- polisacáridos capsulares de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Clostridium difficile*
- o
- lipopolisacáridos de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae* y *Salmonella choleraesuis*;
- a) polifuncionalidad mediante el desacoplamiento de O-des-hidrógeno por medio de oxidación y aminación reductiva formando enlaces reducidos imina con un espaciador de alquildiamina, a continuación modificados para formar ésteres activos;
- b) acoplamiento simultáneo de las al menos tres estructuras de carbohidrato derivadas de éster a los grupos amino de la proteína transportadora polifuncional Enterotoxide A o Citotoxide B de *Clostridium difficile*, a través de la formación de enlaces amida;
- en donde al menos un mol de portador de proteína se hace reaccionar con al menos un mol de cada una, o su suma molar, de dichas estructuras de carbohidrato antigénicamente diferentes.
17. Un procedimiento de conjugación de acuerdo con la reivindicación 16, en donde las estructuras de carbohidrato se activan químicamente en sus correspondientes derivados de ácido diamínico butírico y los ésteres activos son ésteres de succinimidilo.
18. Un procedimiento de conjugación para preparar la construcción molecular multivalente antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende el acoplamiento simultáneo de los grupos amino de la proteína transportadora polifuncional Enterotoxide A o Citotoxide B de *Clostridium difficile* con al menos tres estructuras de carbohidrato antigénicamente diferentes seleccionadas entre:
- polisacáridos capsulares de *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Clostridium difficile* o
- lipopolisacáridos de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae* y *Salmonella choleraesuis*;
- por medio de aminación reductiva formando enlaces reducidos imina, siendo tales estructuras de carbohidrato activadas previamente a polifuncionalidad, con o sin espaciadores moleculares, mediante desacoplamiento de O-des-hidrógeno en los grupos hidroxilo próximos, por medio de oxidación.
19. Un procedimiento de conjugación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, que comprende adicionalmente una etapa adicional de destoxificación de dichos lipopolisacáridos alternativamente mediante a) escisión del radical de Lípido A antes o después de que se lleve a cabo la reacción de acoplamiento, o b) saturación del sitio de unión a Lípido A a través de una estrategia específica que utiliza los Péptidos Sintéticos Anti-Endotoxina (SAEP), antes o después de que se lleve a cabo la reacción de acoplamiento;
- en donde al menos un mol de portador de proteína se hace reaccionar con al menos un mol de cada una, o su suma molar, de dichas estructuras de carbohidrato antigénicamente diferentes.
20. Un procedimiento de conjugación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-19, en donde las estructuras de carbohidrato de la etapa a) comprenden al menos uno de los epítomos básicos repetitivos que consisten en un mínimo de cinco a doce residuos monosacáridos de acuerdo con la determinación de la masa molecular y la espectroscopía de RMN, siendo dichos epítomos básicos repetitivos evaluados antigénicamente por reactividad con anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de tipo o específicos de grupo mediante la

determinación de sus respectivos valores de CIM50 en la inhibición de su sistema de referencia de Polisacárido-Anticuerpo homólogo.

21. Construcción molecular multivalente antigénica que puede obtenerse mediante el procedimiento de conjugación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-20.