

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 653**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2012 PCT/US2012/037961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12158701**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2012 E 12786365 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2709656**

54 Título: **Composiciones vacunales con una matriz proteica que incluye policationes**

30 Prioridad:

**18.05.2011 US 201161487663 P**

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

**28.10.2019**

73 Titular/es:

**MATRIVAX, INC. (100.0%)  
2nd Floor, Le Prince de Galles, 3-5 Avenue des  
Citronniers  
98000 Monaco, MC**

72 Inventor/es:

**KILLEEN, KEVIN, P. y  
CARTEE, ROBERT, T.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 728 653 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

Composiciones vacunales con una matriz proteica que incluye policonaciones

## 5 ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para producir vacunas. También se describe una composición inmunógena y métodos de administración de vacunas. En concreto la presente invención se refiere a vacunas de matriz proteica que incluyen un antígeno útil atrapado en una matriz proteica transportadora, reticulada, en las cuales se utiliza poli-  
10 L-lisina u otro(s) policonación(es) para la formación de la matriz proteica que atrapa el antígeno.

## ANTECEDENTES DE LA DE LA PRESENTE INVENCION

La vacunación contra las infecciones bacterianas es una actividad médica importante que representa una intervención preventiva recomendada prácticamente para todas las personas. El diseño de las vacunas para combatir la infección bacteriana o la patogénesis de la infección bacteriana suele dirigirse a las proteínas bacterianas como toxina producida por una bacteria. Tal es el caso, por ejemplo, en las vacunas contra el ántrax, la difteria y el tétanos. Otro enfoque de la vacunación se dirige a la cápsula externa de una bacteria; sin embargo muchos de los antígenos provistos de una cápsula envolvente de un agente patógeno bacteriano estimulan poca o ninguna respuesta inmunitaria duradera, lo cual complica su uso en la creación de vacunas efectivas. Las cápsulas constituyen la superficie externa de muchas bacterias y normalmente están formadas por polímeros de compuestos orgánicos como carbohidratos, aminoácidos o alcoholes. Las cápsulas son bastante diversas químicamente. En las cápsulas basadas en polisacáridos, las unidades sacáridas pueden estar unidas entre sí según varias configuraciones moleculares y además pueden ir sustituidas con fosfato, nitrógeno, sulfato y otros modificadores químicos. Las cápsulas pueden ser un factor de virulencia, al impedir  
25 que los microbios sean fagocitados y eliminados eficientemente por los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares del huésped.

Los anticuerpos contra las cápsulas proporcionan una potente defensa contra los organismos encapsulados al mediar en la fijación del complemento en la superficie microbiana, lo cual puede producir la lisis bacteriana o la opsonización, absorción y muerte por las células inmunes fagocíticas del huésped. Los anticuerpos más potentes contra las cápsulas microbianas son los anticuerpos IgG. Los antígenos capsulares suelen clasificarse como antígenos T-independientes porque provocan respuestas inmunes en las cuales no intervienen células T y por lo tanto no desencadenan respuestas inmunológicas de larga duración. No obstante, el acoplamiento covalente de una proteína a un antígeno capsular hace que el antígeno capsular sea "T-dependiente", y entonces estos antígenos T-dependientes provocan una respuesta de células B de memoria basadas en IgG mediada por células T (T<sub>H</sub>-dependientes), o anamnésica.  
35

Se han estudiado diversos métodos para que los antígenos de las vacunas resulten más inmunógenos e idealmente dependientes de T. La mayoría de los polisacáridos de la superficie bacteriana son inmunógenos por sí mismos y son capaces de provocar una respuesta inmune que reconozca el antígeno natural en la cápsula microbiana. Sin embargo, cuando los polisacáridos capsulares se utilizan solos como vacunas no suelen promover una inmunidad duradera, ni son muy efectivos para inmunizar a niños menores de 2 años. Se ha demostrado que la unión covalente de un antígeno polisacárido a una proteína transportadora puede subir en gran medida la inmunogenicidad del polisacárido y promover la deseada respuesta inmune T-dependiente (o memoria inmunológica), que protege al huésped contra las infecciones posteriores causadas por el microorganismo portador del antígeno. Así, por ejemplo, una vacuna neumocócica no conjugada como la Pneumovax® de Merck es eficaz contra la enfermedad neumocócica invasiva en las personas, sin embargo es ineficaz (p.ej. en bebés) para provocar la memoria inmunológica y la inmunidad protectora deseada, que proporcionaría inmunidad duradera y evitaría la necesidad de inmunizaciones repetidas. Las vacunas neumocócicas conjugadas como la Prevnar® de Pfizer (Pfizer Inc., EUA) han resultado altamente inmunógenas, incluso en lactantes de 2 meses, inducen la inmunidad T-dependiente y son muy eficaces.  
50

Sin embargo, aunque las vacunas conjugadas son inmunológicamente prometedoras, pueden ser extremadamente difíciles y complejas (y caras) de producir, lo cual frena en gran medida su distribución a quienes necesitan vacunación en todo el mundo. Por ejemplo, en el caso de la Prevnar®7, cada cepa de *S. pneumoniae* empleada para proporcionar los siete antígenos polisacáridos utilizados en la conjugación se cultiva en un biorreactor; se recolectan las células y el polisacárido se extrae, se purifica y se hidroliza hasta el tamaño apropiado; los antígenos individuales se conjugan luego con un vehículo proteico; el conjugado se repurifica, se mezcla con los otros 6 complejos de polisacárido-proteína (conjugados) preparados de forma similar; y por último se añade alumbre como adyuvante a la mezcla multiconjugada. Se estima que hay más de 200 etapas de GMP en la producción de la vacuna Prevnar® heptavalente.  
55

Recientemente se han propuesto vacunas de matriz proteica como una alternativa a las vacunas conjugadas. Véase la solicitud de patente de EUA publicada con el n° US-2008-0095803 (Mekalanos, J.) el 24 de abril de 2008; la solicitud de patente internacional publicada con el n° WO 2008/021076 (Mekalanos, J.) el 21 de febrero de 2008; y la solicitud de patente internacional publicada con el n° WO 2011/031893 (Killeen, K. y otros) el 17 de marzo de 2011). En vez de conjugar covalentemente un antígeno útil con un vehículo, una vacuna de matriz proteica atrapa el antígeno en una matriz proteica portadora preparada por reticulación de la proteína transportadora en presencia del antígeno deseado. Se evita la unión covalente característica del antígeno a la proteína transportadora y en cambio el antígeno permanece  
60  
65

asociado a la matriz, al quedar atrapado por la proteína portadora durante la formación de la matriz (reacción de reticulación). Se ha demostrado que estas vacunas de matriz proteica proporcionan mayor inmunogenicidad que las vacunas preparadas utilizando el antígeno solo, y que las vacunas de matriz proteica también pueden provocar el tipo de respuesta inmune (es decir, la inducción de la inmunidad T-dependiente) observada con las vacunas conjugadas.

5 La síntesis de vacunas de matriz proteica no conlleva reacciones de conjugación complicadas y normalmente requiere menos etapas de procesamiento, lo cual, a su vez, hace que las vacunas de matriz proteica sean menos costosas de producir que una vacuna conjugada.

A pesar de que las vacunas de matriz proteica proporcionan varias ventajas, el título de los anticuerpos específicos del antígeno provocados por las vacunas de matriz proteica es a menudo más bajo que el título provocado por una vacuna conjugada correspondiente. La patente WO 2011/031893 demuestra que la separación de las vacunas de matriz proteica por cromatografía de exclusión de tamaños, seleccionando las fracciones que contienen partículas de matriz proteica de alto peso molecular para la inmunización, puede proporcionar títulos similares a los provocados por las vacunas de polisacáridos conjugados.

15 La patente WO 2011/036560 describe composiciones de glicoconjugados, con oligosacáridos unidos a estructuras multivalentes, para usar en vacunas y en la unión a anticuerpos.

20 La patente WO 2005/058940 describe métodos para producir conjugados de inmunógenos peptídicos con moléculas portadoras de proteínas/polipéptidos, los cuales son útiles como inmunógenos porque los inmunógenos peptídicos se conjugan con vehículos proteicos mediante grupos funcionales activados de los restos de aminoácidos del vehículo o de la molécula conectora opcionalmente ligada, y porque cualquier grupo funcional reactivo no conjugado de los restos de aminoácidos se inactiva por bloqueo, conservando así la funcionalidad inmunológica de la molécula portadora, pero reduciendo la tendencia a reacciones indeseadas que pudieran hacer el conjugado menos seguro o efectivo.

25 Huo y otros (Infect. Immun. 2005, 73, 12, 8256-8265) describen la inducción de niveles de inmunidad meningocócica y diftérica asociada a la protección contra la enfermedad, por insuflación de Menjugate-C en quitosano con una jeringa.

30 Baudner y otros (J. Drug Targeting, 2005, 13 (8-9), 489-498) describen la evaluación del quitosano y de su derivado cloruro de N-trimetil quitosano (TMC), administrados como suspensiones de micropartículas o polvo, y del adyuvante mucosal atóxico LTK633 para la inmunización intranasal con la vacuna conjugada meningocócica del grupo C (CRM-MenC).

35 La patente US 6,458,387 describe unos métodos para formar microesferas de liberación prolongada. Las microesferas tienen una superficie lisa que incluye una multitud de aberturas acanaladas de diámetro inferior a 1000 angstroms.

40 Sin embargo, en este campo constituye un problema técnico persistente el disponer de medios para producir vacunas de matriz proteica con mayor inmunogenicidad, a fin de poder beneficiarse de la promesa científica y de las ventajas de fabricación y coste de esta nueva tecnología. Hay una necesidad continua de vacunas de matriz proteica mejoradas que tengan mayor inmunogenicidad o potencia.

#### RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

45 La presente invención proporciona un método para producir una composición inmunógena que lleva un antígeno útil atrapado en la matriz de proteína transportadora/policación, el cual está unido de forma no covalente a dicha matriz de proteína transportadora/policación. Dicho método consiste en

- (i) mezclar un antígeno útil - elegido del grupo formado por un polisacárido, un polialcohol como forma hidrogenada de un carbohidrato, en el cual un grupo carbonilo se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario, y un homopolímero de aminoácido - con una proteína transportadora y un policación para formar una mezcla;
- 50 (ii) añadir un conector que reticle dicha proteína transportadora y dicho policación mediante los grupos sulfhidrilo, amino o carboxilo de la proteína transportadora y del policación, y
- (iii) reticular dicha proteína transportadora y dicho policación para formar una matriz de proteína transportadora/policación.

55 Con las vacunas preparadas según la presente invención se ha logrado un avance sorprendente en la efectividad y el rendimiento de las vacunas de matriz proteica, en las cuales se usa poli-L-lisina (PLL) u otro policación para formar la matriz proteica que atrape un polisacárido u otro antígeno. Por lo tanto, la calidad y el rendimiento de las vacunas de matriz proteica se han mejorado, no por modificación del antígeno o antígenos, sino por la atención a la naturaleza y composición de la matriz empleada para atrapar el antígeno o los antígenos.

60 En el presente documento se describen nuevas vacunas de matriz proteica y métodos para mejorar el atrapamiento de polisacáridos en la matriz mediante el uso de policaciones que contienen aminas primarias.

65 También se describe una composición inmunógena que lleva (1) uno o más antígenos útiles, (2) una o más proteínas transportadoras y (3) uno o más policaciones, en la cual dicha proteína transportadora y opcionalmente dicho policación se reticular para formar una matriz proteica, y dicho antígeno útil está atrapado en dicha matriz proteica. Estas

composiciones pueden prepararse fácilmente mezclando el antígeno, la proteína transportadora y los componentes policatiónicos, e iniciando una reacción para provocar la reticulación de la proteína transportadora y/o del policatión. Las composiciones vacunales de matriz proteica que incorporan un policatión, por ejemplo,  $\alpha$ -PLL tienen una mayor inmunogenicidad en comparación con el antígeno solo, en comparación con una mezcla de antígeno y vehículo, y en comparación con una composición vacunal de matriz proteica que no lleva un policatión.

El policatión o policaciones de la composición inmunógena se seleccionan preferiblemente del grupo formado por: poli-L-lisina, poli-L-arginina, poli-ornitina, espermidina, espermina, quitosano [un copolímero unido por enlace  $\beta$ -(1-4) de 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucano (GlcN) y 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucano (GlcNAc)], polietiliminina ramificada (PEI), poliamina N7 (CAS 29320-38-5) y etilendiaminometil poliestireno (CAS 177987-93-8). Preferiblemente dicho policatión es poli-L-lisina (PLL).

Preferiblemente, dicha poli-L-lisina es alfa poli-L-lisina ( $\alpha$ -PLL;  $\alpha$ PLL) o épsilon poli-L-lisina ( $\epsilon$ -PLL;  $\epsilon$ PLL).

Dicha composición comprende preferiblemente partículas de matriz proteica que tienen un tamaño medio de partícula superior a 50 nm de diámetro. Estas composiciones se pueden preparar fácilmente mezclando el antígeno, la proteína transportadora y los componentes policatiónicos, iniciando una reacción para reticular la proteína transportadora y/o el policatión, y procesando los productos de reacción para eliminar las especies de peso molecular más bajo.

También se describe una composición vacunal que lleva un antígeno útil y una matriz de proteína transportadora/policatión, en la cual el antígeno es atrapado en la matriz de proteína transportadora/policatión formando un complejo. El complejo de antígeno/matriz de proteína transportadora/policatión tiene preferiblemente un tamaño del diámetro medio de partícula por encima de 50 nm. El complejo tiene preferiblemente un tamaño del diámetro medio de partícula superior a 100 nm, superior a 150 nm, superior a 200 nm, superior a 500 nm, superior a 1000 nm, superior a 2000 nm o incluso mayor, p.ej. hasta los límites metodológicos para separar las partículas de la matriz proteica. Los complejos de antígeno/matriz de proteína transportadora/policatión de la composición vacunal abarcarán preferiblemente un rango de tamaños de partícula por encima de los 50 nm de diámetro, por ejemplo de 50 hasta 2000 nm de diámetro, o selecciones dentro de este rango, p.ej. 100 - 200 nm, 200 - 400 nm, 250 - 500 nm, 120 - 1000 nm, 200 - 2000 nm y otros rangos de tamaño de partícula similares. La composición incluye preferiblemente complejos que tienen tamaños de partícula de 50 - 150 nm de diámetro.

La relación molar de antígeno a proteína transportadora está comprendida preferiblemente entre 1 a 10 y 10 a 1.

El porcentaje en peso de policatión en la mezcla reactiva es preferiblemente del 0,005 al 0,10%, o está comprendido en el intervalo de 0,05 mg/ml - 0,5 mg/ml.

Además la composición inmunógena incluye preferiblemente dos o más antígenos útiles, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más antígenos útiles.

Las composiciones vacunales de matriz proteica de la presente invención, cuando se administran a un mamífero, provocan preferiblemente una respuesta inmune dependiente de células T en el mamífero (es decir, confieren memoria inmunológica al huésped vacunado).

En las formas de ejecución deseables de la presente invención, dicho antígeno útil es un polisacárido.

En otras formas de ejecución deseables de la presente invención el polisacárido se selecciona del grupo formado por un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*, un polisacárido de *Francisella tularensis*, un polisacárido de *Bacillus anthracis*, un polisacárido de *Haemophilus influenzae*, un polisacárido de *Salmonella Typhi*, un polisacárido de *Citrobacter freundii*, un polisacárido de especies de *Salmonella*, un polisacárido de *Shigella* o un polisacárido de *Neisseria meningitidis*. Los antígenos O de bacterias Gram negativas y una parte de LPS (lipopolisacárido) que es única, y con frecuencia un antígeno protector de la infección bacteriana, también son antígenos útiles adecuados para el uso según la presente invención.

En otras formas de ejecución deseables de la presente invención dicho polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* se selecciona entre uno o más polisacáridos del grupo formado por los de tipo capsular 3, 4, 6B, 7A, 7B, 7C, 7F, 9A, 9L, 9N, 9V, 12A, 12B, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 17, 18B, 18C, 19F, 23F, 25A, 25F, 33F, 35, 37, 38, 44 y 46.

En las formas de ejecución preferidas, la proteína o proteínas transportadoras se eligen del grupo formado por toxoide diftérico, p.ej. el fragmento proteico CRM197 no tóxico de la toxina diftérica, toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante de la misma, subunidad B de la toxina del cólera, fragmento C de la toxina tetánica, flagelina bacteriana, neumolisina, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, toxina tipo shiga, proteína LTB humana, listeriolisina O, un extracto proteico de células bacterianas completas, el inhibidor negativo dominante (DNI) mutante del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*.

La composición inmunógena lleva preferiblemente un antígeno útil atrapado en una matriz de proteína transportadora/policonización e incluye además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En formas de ejecución preferidas la presente invención incluye otro método para preparar una composición vacunal. Este método consiste en (i) mezclar uno o más antígenos útiles, una o más proteínas transportadoras y uno o más policonizaciones y (ii) agregar un agente de reticulación capaz de formar enlaces cruzados entre moléculas de proteínas transportadoras, entre diferentes sitios de la misma molécula de proteína transportadora y/o entre la molécula de proteína transportadora y el policonización, y (iii) iniciar una reacción de reticulación. El método de preparación de una vacuna según la presente invención también incluirá preferiblemente una etapa adicional (iv) de seleccionar opcionalmente complejos de productos de reacción de reticulación que tengan un tamaño de partícula de diámetro superior a 50 nm. En algunos casos, en que los grupos reactivos del reactivo reticulante y los sitios reactivos de la proteína transportadora pueden reaccionar por contacto, las etapas de mezcla e iniciación (ii) y (iii) tendrán lugar simultáneamente o se considerarán como una sola etapa. También puede ser conveniente detener la reacción de reticulación, incluyendo una etapa después de la etapa de inicio de la reacción, a fin de atenuar la reacción de reticulación, p.ej. añadiendo un agente apropiado de extinción o bloqueo.

La presente invención tiene utilidad en un método para provocar una respuesta inmune de un mamífero a un antígeno útil o para vacunar a un sujeto contra un agente infeccioso. El método consiste en administrar al mamífero o al sujeto una composición inmunógena como la descrita aquí. El mamífero es preferiblemente un ser humano.

También se describe aquí una composición vacunal que contiene dos o más composiciones inmunógenas descritas en el presente documento.

Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, de las figuras y de las reivindicaciones.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La **fig. 1** es una gráfica que representa la separación de las reacciones de PCMV de Vi-CRM197, con y sin poli-L-lisina (PLL), mediante cromatografía de exclusión de tamaños. El polisacárido Vi solo, una reacción de PCMV de Vi-CRM197 que contenía PLL y una PCMV de Vi-CRM que no contenía PLL se separaron en una columna de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). La proporción de polisacárido Vi en las fracciones se determinó mediante el ensayo de tinción con Stains-all.

La **fig. 2** es una gráfica que representa la separación de una PCMV de Vi-CRM197- $\alpha$ PLL (150-300 kDa) por cromatografía de exclusión de tamaños. La reacción de PCMV se separó en una columna de Sephacryl S-100 de 150 ml (30 cm x 2,6 cm). La proporción de polisacárido Vi y de proteína en las fracciones se determinó mediante el ensayo Stains-all y el ensayo microBCA, respectivamente. El recuadro sombreado indica aquellas fracciones que se agruparon y utilizaron para inmunizar ratones en un ensayo preclínico.

La **fig. 3** es una gráfica que representa la separación de una PCMV de Vi-CRM197- $\alpha$ PLL (150-300 kDa) por cromatografía de exclusión por tamaño. La reacción de PCMV se separó en una columna de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). La proporción de polisacárido Vi y de proteína en las fracciones se determinó mediante el ensayo Stains-all y el ensayo microBCA, respectivamente. Los recuadros sombreados indican las fracciones que se agruparon y utilizaron para inmunizar ratones en un ensayo preclínico.

La **fig. 4** es una gráfica que representa la separación del polisacárido neumocócico 18C (PPS18C) y una PCMV de PPS18C-CRM $\alpha$ PLL (15-30 kDa) mediante cromatografía de exclusión de tamaños. El PPS18C y una PCMV de PPS18C-CRM-PLL- se separaron en una columna de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). La proporción de polisacárido en las fracciones se determinó por el ensayo de antrona y la proporción de proteína se determinó mediante el ensayo de proteínas microBCA.

La **fig. 5** es una gráfica que representa el aumento de la cantidad de Vi atrapado al subir la proporción de  $\alpha$ PLL. Se agregaron 4 mg/ml de Vi a reacciones de PCMV que contenían 0,01% de  $\alpha$ PLL (150-300 kDa), 0,02% de  $\alpha$ PLL (150-300 kDa), 0,02% de  $\alpha$ PLL (150-300 kDa) o 0,04% de  $\alpha$ PLL (150-300 kDa). Después de añadir glutaraldehído y CRM197 las reacciones se separaron en una columna de exclusión de tamaño de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). Las fracciones se analizaron para encontrar las proporciones de polisacárido y proteína mediante el ensayo Stains-all y el ensayo microBCA, respectivamente.

La **fig. 6** es una gráfica que representa la separación de una PCMV trivalente de un grupo de PPS (PPS4, PPS18C, PPS23F)-CRM197- $\epsilon$ PLL mediante una cromatografía de exclusión de tamaños. Se añadieron tres polisacáridos neumocócicos (1,3 mg/ml de PPS4, PPS18C y PPS23F respectivamente) a una única reacción de PCMV. La reacción se separó en una columna de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). Las fracciones de la columna se analizaron para determinar el total de polisacárido y de proteína mediante los ensayos de antrona y microBCA, respectivamente. El recuadro sombreado indica las fracciones que se agruparon para inmunizar ratones en un ensayo preclínico de inmunogenicidad.

La **fig. 7** es una gráfica que representa la separación de una PCMV 13-valente de PPS agrupados-CRM197- $\alpha$ PLL (150-300 kDa) por cromatografía de exclusión de tamaños. Los 13 polisacáridos neumocócicos presentes en la vacuna conjugada Pevnar® 13 se añadieron a una única reacción de PCMV (0,3 mg/ml de cada polisacárido). La reacción se separó en una columna de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). Las fracciones de la columna se analizaron para determinar el total de polisacárido y de proteína mediante los ensayos de antrona y microBCA,

respectivamente. El recuadro sombreado indica las fracciones que se agruparon para inmunizar ratones en un ensayo preclínico de inmunogenicidad.

La **fig. 8** es una gráfica que representa la separación de una PCMV trivalente de un grupo de PPS (PPS4, PPS18C, PPS23F)-CRM197- $\alpha$ PLL (150-300 kDa) mediante una cromatografía de exclusión de tamaños. Se agregaron tres polisacáridos neumocócicos (1,3 mg/ml de PPS4, PPS18C y PPS23F respectivamente) a una única reacción de PCMV. La reacción se separó en una columna de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). Las fracciones de la columna se analizaron para determinar el total de polisacárido y de proteína mediante los ensayos de antrona y microBCA, respectivamente. El recuadro sombreado indica las fracciones agrupadas para inmunizar ratones en un ensayo preclínico de inmunogenicidad.

La **fig. 9** es una gráfica que representa la separación de una PCMV 23-valente de PPS agrupados-CRM197- $\alpha$ PLL (150-300 kDa) por cromatografía de exclusión de tamaños. Los 23 polisacáridos presentes en la vacuna de solo polisacáridos Pneumovax® se agregaron a una única reacción de PCMV (0,17 mg/ml de cada polisacárido). La reacción se separó en una columna de Sephacryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm). Las fracciones de la columna se analizaron para determinar el total de polisacárido y de proteína mediante los ensayos de antrona y microBCA, respectivamente. El recuadro sombreado indica las fracciones que se agruparon para inmunizar ratones en un ensayo preclínico de inmunogenicidad.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

Las vacunas de matriz proteica, y en particular las vacunas de matriz capsular proteica (PCMV), están descritas en la patente estadounidense US-2008-0095803 (Mekalanos, J.), publicada el 24 de abril de 2008; en la solicitud de patente internacional nº WO 2008/021076 (Mekalanos, J.), publicada el 21 de febrero de 2008; y en la solicitud de patente internacional nº WO 2011/031893 (Killeen, K. y otros), publicado el 17 de marzo de 2011. Estas publicaciones revelan que las vacunas de matriz proteica tienen propiedades inmunológicas tan potentes como las de las típicas vacunas conjugadas de PS-proteína, pero difieren convenientemente de las vacunas conjugadas en que no tiene lugar ninguna unión covalente significativa para acoplar el antígeno útil a la proteína transportadora. Por consiguiente las vacunas de matriz proteica (complejos de matriz de proteína transportadora/antígeno) se distinguen de las vacunas conjugadas convencionales en las que el antígeno está unido covalentemente a un vehículo. En una vacuna de matriz proteica el antígeno útil, p.ej. polisacáridos, polímeros orgánicos capsulares u otro tipo de antígeno, está atrapado dentro de una matriz proteica transportadora.

Cuando un biopolímero o un polisacárido capsular de un patógeno están atrapados en una matriz proteica reticulada, las respectivas vacunas se denominan vacunas de matriz capsular proteica (PCMV). Tal como se describe en las patentes WO 2008/021076 y US 2008-0095803 se produjeron PCMV basadas en el modelo de antígeno capsular T-independiente poli(ácido-gamma-D-glutámico) (PGA), así como en ácido alginico (alginato) y dextrano, y en la proteína transportadora del ejemplo, el mutante inhibidor negativo dominante (DNI). El DNI es una forma mutada del antígeno protector (PA) de *B. anthracis* y se produjo a partir de *Escherichia coli* por el método de Benson y otros, *Biochemistry*, 37:3941-3948 (1998). En la patente WO 2011/031893 se describen otras formas de ejecución de PCMV, así como las ventajas de fraccionar las partículas de PCMV por tamaño.

La presente invención se refiere a los hallazgos y observaciones hechos respecto al aumento de la inmunogenicidad y del rendimiento de las composiciones vacunales de matriz proteica mediante el atrapamiento mejorado del antígeno en la matriz proteica.

Para una comprensión más clara de la presente invención se utilizan las siguientes abreviaturas y términos definidos a continuación.

Las referencias a composiciones o métodos descritos en la presente invención como "que comprenden" uno o más elementos o etapas no son concluyentes, lo cual significa que dichos elementos o etapas son esenciales, pero que también pueden agregarse otros elementos o etapas dentro del ámbito de la composición o del método. Con el fin de evitar redundancias, también se entiende que cualquier referencia a una composición o método descritos como "que comprenden" (o que "comprende") uno o más elementos o etapas describe una correspondiente composición o método más limitado "que consta básicamente de" (o que "constan básicamente de") los mismos elementos o etapas citadas, lo cual significa que la composición o método incluyen los citados elementos o etapas esenciales y además pueden incluir otros elementos o etapas que no alteren realmente las características básicas y novedosas de la composición o del método. También se entiende que cualquier composición o método descrito en la presente invención como "que comprende" o "que consta básicamente de" uno o más elementos o etapas enumeradas también describe la respectiva composición o método más limitado y concluyente "que consta de" (o "que constan de") dichos elementos o etapas, excluyendo cualquier otro elemento o etapa no enumerada. En cualquier composición o método aquí revelado, los equivalentes conocidos o revelados de cualquier elemento o etapa esencial citada pueden sustituir a este elemento o etapa. También se entiende que un elemento o etapa "seleccionada del grupo formado por" se refiere a uno o más de los elementos o etapas de la lista subsiguiente, incluyendo las combinaciones de dos o más de los elementos o etapas enumeradas.

Tal como se usa aquí, el término "administrar" referido a una composición vacunal significa proporcionar la composición vacunal a un sujeto, como por ejemplo un ser humano, en una dosis suficiente para inducir en el sujeto una respuesta

inmune productora de anticuerpos unidos específicamente a un antígeno contenido en la composición vacunal (es decir, un antígeno que en las vacunas terapéuticas corresponde a un marcador antigénico sobre un agente patógeno). La administración conveniente incluye la inyección intramuscular, la inyección intradérmica, la inyección intravenosa, la inyección intraperitoneal, la inyección subcutánea o transcutánea, la inhalación o la ingestión, en función de la forma de dosificación y de la naturaleza y actividad de la composición vacunal que debe administrarse. La administración puede consistir en una administración única de una vacuna o en la administración de una vacuna en múltiples dosis. De forma adecuada se diseña una segunda administración ("de refuerzo") para aumentar la producción de anticuerpos en un sujeto y prevenir la infección por un agente infeccioso. La frecuencia y cantidad de la dosis de vacuna depende de la actividad específica de la vacuna y se puede determinar fácilmente mediante experimentación rutinaria.

El término "reticular" o "reticulación" significa formación de un enlace covalente entre dos moléculas, macromoléculas o combinación de moléculas, p.ej. moléculas de proteínas transportadoras, o entre dos sitios de la misma molécula, p.ej. entre dos restos de aminoácidos de la misma proteína, o entre las moléculas de proteína portadora y las moléculas de poliacilación, bien directamente, cuando se usa un conector de "longitud cero" (creando un enlace directo), o mediante el uso de una molécula reticulante bifuncional que forme un puente molecular o un enlace entre dos sitios reactivos. Los reticulantes bifuncionales poseen dos grupos funcionales, capaces respectivamente de formar un enlace covalente con una de dos moléculas separadas o entre dos grupos separados de la misma molécula (es decir, formando "bucles" o "pliegues" dentro de una molécula tal como una proteína transportadora). Como ejemplos de conectores cabe citar los reticulantes bifuncionales que son capaces de reticular dos moléculas de proteína transportadora y/o dos moléculas de poliacilación y/o una molécula de proteína transportadora con una molécula de poliacilación

Tal como se emplea aquí, el término "antígeno" se refiere a cualquier molécula o combinación de moléculas que están fijadas por un anticuerpo o por un fragmento de anticuerpo.

Tal como se usa aquí, el término "reticulante bifuncional" o "conector bifuncional" se refiere a un compuesto que tiene dos grupos funcionales capaces de formar independientemente uno de otro un enlace covalente con grupos reactivos de dos moléculas, con átomos o conjuntos de moléculas separadas que se desea unir entre sí. En G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, 1996) y Dick y Beurret, "Glycoconjugates of Bacterial Carbohydrate Antigens", en *Conjugate Vaccines* (Cruse y Lewis, eds), *Contrib. Microbiol. Immunol.* Basilea, Karger, 1989, vol. 10, págs. 48-114), por ejemplo, se describen ejemplos de conectores bifuncionales. Como conector bifuncional adecuado cabe citar el glutaraldehído, el bis[sulfosuccinimidil]suberato o el adipimidato de dimetilo.

Tal como se emplea aquí, el término "conector" o "reticulante" se refiere a un compuesto capaz de formar un enlace o puente químico covalente que una dos o más moléculas o dos o más sitios de la misma molécula. Como ejemplos adecuados de conectores cabe citar p.ej. el glutaraldehído u otros dialdehídos de fórmula  $\text{OHC-R-CHO}$ , en la cual R es un radical alqueno divalente lineal o ramificado de 1 hasta 12 átomos de carbono, un radical heteroalquilo divalente lineal o ramificado de 1 hasta 12 átomos, un radical alquenileno divalente lineal o ramificado de 2 hasta 12 átomos de carbono, un radical alquilileno divalente lineal o ramificado de 2 hasta 12 átomos de carbono, un radical aromático divalente de 5 hasta 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 hasta 10 átomos,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$  en el cual q es 1 hasta 4 o un enlace químico directo que une dos grupos aldehído. El enlace puede ser directo sin el uso de una molécula conectora (puente). Por ejemplo, un grupo carboxilo de un resto Asp o Glu, por ejemplo en la cadena lateral de una proteína transportadora, se puede unir directamente a un grupo amino libre, por ejemplo de un resto Lys en la cadena lateral, mediante la química de carbodiimida o enzimáticamente utilizando transglutamidinas que catalizan la reticulación entre grupos amino libres y grupos carboxamida, p.ej. de restos Gln.

El término "estímulo" en el sentido de provocar la producción de anticuerpos se refiere a la activación de las células B de memoria que tiene lugar durante una segunda exposición a un antígeno. También se conoce como una "respuesta inmunitaria secundaria" y es indicativo de una respuesta inmune de memoria "secundaria" duradera, que da como resultado la capacidad persistente de producir anticuerpos.

El término "proteína transportadora" en el contexto de una composición vacunal se refiere a una proteína empleada en la composición de una vacuna que provoca una respuesta inmune a ella misma y/o a un antígeno asociado o complejo con dicha proteína transportadora y un poliacilación. En una composición vacunal de matriz proteica según la presente descripción, un antígeno está atrapado en una matriz de proteínas transportadoras que están reticuladas entre sí y/o con poliacilaciones, preferiblemente sin ningún enlace covalente significativo del antígeno a la matriz. En una composición de vacuna conjugada hay un antígeno reaccionado con una proteína transportadora, de tal forma que el antígeno y la proteína transportadora están unidos covalentemente entre sí por diseño. Es conveniente que la proteína transportadora contenga epítopos reconocidos por un linfocito T colaborador. La definición de "proteína transportadora" también abarca los péptidos multiantigénicos (MAP), es decir, péptidos ramificados que tienen una multitud de sitios reactivos. Es deseable que un MAP incluya restos de lisina (Lys). Los ejemplos de proteínas transportadoras idóneas incluyen toxinas y toxoides (químicos o genéticos) que pueden mutarse, p.ej. para reducir la reactogenicidad. Las proteínas transportadoras adecuadas incluyen p.ej. la toxina diftérica o un mutante no tóxico de la misma, p.ej. toxoide diftérico, la toxina tetánica o un mutante no tóxico de la misma, p.ej. toxoide tetánico, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante no tóxico, la subunidad B de la toxina del cólera, el fragmento C de toxina tetánica, flagelina bacteriana, neumolisina, listeriolisina O (LLO y moléculas relacionadas), una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, la proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*,

toxina tipo shiga, proteína LTB humana, un extracto proteico de células bacterianas completas, el inhibidor negativo dominante (DNI) mutante del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*; o cualquier otra proteína que se pueda reticular para formar una matriz capaz de atrapar un antígeno útil.

5 Tal como se usa aquí, el término "atrapado" referido a un antígeno significa asociación o formación de complejos de un antígeno con una proteína transportadora y un policatión, en particular con una proteína transportadora reticulada también opcionalmente con una molécula policatiónica, para formar una matriz que constituye la asociación o complejo con el antígeno, de modo que el antígeno permanezca en el complejo con la proteína transportadora y el policatión en entornos fisiológicos. El antígeno está atrapado convenientemente en un complejo con proteínas transportadoras y un policatión en ausencia de un enlace covalente significativo entre el antígeno y una proteína transportadora/policatión. Tal como se usa aquí, "ausencia de enlace covalente significativo" significa que no más del 50% del antígeno se une covalentemente a una proteína transportadora. En una composición vacunal de matriz proteica es conveniente que no más del 40%, no más del 30%, no más del 20%, no más del 10% o sobre todo no más del 5% del antígeno esté unido covalentemente a la proteína transportadora o al policatión. Como podrá apreciarse a partir de la siguiente revelación, el objeto del diseño y de la producción de la vacuna de matriz proteica es evitar la unión química dificultosa del antígeno a un vehículo, que es la cualidad principal de las vacunas conjugadas. En una vacuna de matriz proteica el antígeno está asociado con el vehículo por atrapamiento en una matriz reticulada en lugar de por conjugación con el vehículo, y de hecho, en la medida de lo posible, se evita la reticulación del antígeno con una proteína transportadora o con una matriz de proteína transportadora/policatión. En los procesos de producción de vacunas de matriz proteica el antígeno está incluido en la mezcla de componentes de la matriz que deben ser reticulados, pero el antígeno no participa por diseño en la reacción de reticulación o al menos no participa en proporción significativa en ella. Como consecuencia de la formación de la matriz proteica en presencia del antígeno, éste queda atrapado sin una reticulación significativa en la matriz de proteína transportadora (o en la matriz de proteína transportadora/policatión).

25 Por "infección" se entiende la invasión de un sujeto por un microbio, p.ej. una bacteria, un hongo, un parásito o un virus. La infección puede incluir, por ejemplo, la multiplicación excesiva de microbios que normalmente están presentes en o sobre el cuerpo de un sujeto o la multiplicación de microbios que normalmente no están presentes en o sobre un sujeto. Un sujeto sufre una infección microbiana cuando hay un exceso indeseado de una población microbiana (p.ej. patógena) en o sobre el cuerpo del sujeto, o cuando la presencia de una población o poblaciones microbianas daña las células o causa síntomas patológicos en un tejido del sujeto.

Se entiende por "agente infeccioso" un microbio que causa una infección.

35 El término "inmunógeno" se refiere a un compuesto inductor de una respuesta inmune en un sujeto. Una respuesta inmunitaria es convenientemente una respuesta inmunitaria dependiente de células T, que implica la producción de anticuerpos IgG.

40 El término "polímero capsular microbiano" se refiere a un polímero presente en o sobre el recubrimiento capsular de un microbio. Es conveniente que un polímero capsular microbiano sea un polímero orgánico tal como un polisacárido, un fosfopolisacárido, un polisacárido que contiene un amino azúcar con una sustitución N-acetilo, un polisacárido que contiene un azúcar sulfonilado, otro azúcar modificado con sulfato o un azúcar modificado con fosfato, un polialcohol, un poliaminoácido, ácido teicoico o una cadena lateral O de un lipopolisacárido.

45 "Monómero" se refiere a una estructura molecular capaz de formar dos o más enlaces con monómeros similares, para producir frecuentemente una cadena o una serie de cadenas ramificadas conectadas de subestructuras monoméricas repetidas como parte integrante de un "polímero".

50 "Polímero orgánico" se refiere a un polímero compuesto de monómeros unidos por enlaces covalentes, constituidos respectivamente por átomos de carbono, oxígeno, hidrógeno o nitrógeno, o por restos de fosfato o sulfato. De manera apropiada, un polímero orgánico es un polisacárido, un fosfopolisacárido, un polisacárido que lleva un amino azúcar con una sustitución N-acetilo, un polisacárido que contiene un azúcar sulfonilado, otro azúcar modificado con sulfato o un azúcar modificado con fosfato, un polialcohol, un poliaminoácido, ácido teicoico y una cadena lateral O de un lipopolisacárido.

55 "Polialcohol" significa una forma hidrogenada de un carbohidrato donde un grupo carbonilo se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario. Como ejemplos de polialcoholes cabe citar poli(óxidos de alquileo) (PAO), tales como los polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polimetilenglicol, polietilenglicol (PEG), metoxipolietilenglicol (MPEG) y polipropilenglicol; poli(alcohol vinílico) (PVA); poli(etileno-co-anhídrido maleico); poli(estireno-co-anhídrido málico); dextranos, incluyendo carboximetil-dextranos; celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa; hidrolizados de quitosano; almidones tales como los hidroxietilalmidones y los hidroxipropilalmidones; glucógeno; agarosas y derivados de ellas; goma guar; pululano; insulina; goma xantana; carragenano; pectina; hidrolizados de ácido algínico; sorbita; un alcohol de glucosa, manosa, galactosa, arabinosa, gulosa, xilosa, treosa, sorbosa, fructosa, glicerina, celobiosa maltosa, sacarosa, amilosa, amilopectina; o monopropilenglicol (MPG).

65

“Poliaminoácido” o “poli(aminoácido)” se refiere al menos dos aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico. De forma apropiada, un poliaminoácido es un péptido que contiene una secuencia repetida de aminoácidos o una cadena del mismo aminoácido (es decir, un homopolímero).

5 “Policación” o “policaciónico” se refiere a cualquier ion macromolecular que lleva múltiples cargas positivas. De forma apropiada un policación posee grupos amino libres, como por ejemplo el poliaminoácido poli-L-lisina. Otros ejemplos de policaciones adecuadas que contienen grupos amino libres incluyen polímeros naturales tales como el quitosano (un copolímero con enlaces  $\beta$ -(1-4) de 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucano (GlcN) y 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucano (GlcNAc)), provisto de grupos amino libres en los restos de GlcN que pueden estar reticulados y actuar como el catión,  
10 y polímeros sintéticos comercialmente disponibles con grupos amino libres, tales como polietilenimina ramificada (PEI), poliamina N7 (CAS 29320-38-5) y etilendiaminometil poliestireno (CAS 177987-93-8).

Por “poli-L-lisina” y “PLL” se entiende  $\alpha$ -poli-L-lisina (alfa-poli-L-lisina;  $\alpha$ PLL),  $\epsilon$ -poli-L-lisina (épsilon-poli-L-lisina;  $\epsilon$ PLL; poli[imino[(2S)-2-amino-1-oxo-1,6-hexanodilo]], o combinaciones y copolímeros de los mismos. Los restos de lisina de la poli-L-lisina están unidos mediante un enlace peptídico entre el grupo carboxilo y el grupo amino, alfa ( $\alpha$ PLL) o épsilon ( $\epsilon$ -PLL). La poli-L-lisina es convenientemente  $\alpha$ -poli-L-lisina. La  $\alpha$ -poli-L-lisina se sintetiza químicamente y se puede obtener con varios pesos moleculares, por ejemplo de 0,5 hasta 300 KDa. La  $\epsilon$ -poli-L-lisina es un pequeño homopolímero natural del aminoácido esencial L-lisina, que se produce por fermentación bacteriana; p.ej., la  $\epsilon$ -poli-L-lisina se puede aislar del *Streptomyces albulus*, y tiene una masa molecular media de 4000 Da aproximadamente.

En el contexto de la presente invención una “matriz proteica” es una estructura multimérica formada por reticulación de moléculas de proteína, que tiene uniones o enlaces directos entre dos sitios de la misma molécula de proteína o entre dos sitios de moléculas de proteína diferentes. En el contexto de la presente invención una “matriz de proteína transportadora” se refiere a una matriz proteica formada por una reacción de reticulación llevada a cabo con proteínas transportadoras, en la cual se forman conexiones cruzadas entre sitios reactivos de la misma molécula de proteína transportadora (dando lugar a estructuras de tipo bucle o pliegue intramolecular) o entre sitios reactivos de diferentes moléculas de proteína transportadora (dando lugar a polímeros de proteína transportadora). Tal como se usa aquí, el término “matriz de proteína transportadora/policación” se refiere a una matriz proteica formada por una reacción de reticulación realizada con una mezcla de proteínas transportadoras y policaciones, donde la reticulación tiene lugar al menos dentro o entre las moléculas de proteína transportadora (dando lugar a una matriz de proteína transportadora que puede atrapar los policaciones), o donde se produce una reticulación no solo dentro o entre moléculas de proteína transportadora, sino también dentro o entre moléculas de policación (dando como resultado una matriz que comprende proteína transportadora reticulada y/o monómeros policaciónicos). El grado de reticulación durante la formación de una matriz proteica se puede regular seleccionando lógicamente los reactivos reticulantes y teniendo en cuenta los sitios reactivos disponibles para la reticulación de los componentes monoméricos, ajustando la proporción del reticulante utilizado en la reacción de reticulación, controlando el tiempo de reacción y el uso de reactivos para bloquear los sitios reactivos o detener la reacción de reticulación. El control de estos parámetros repercutirá en la cantidad de antígeno que puede atraparse, en la velocidad a la cual el antígeno atrapado puede disociarse del complejo de matriz proteica/antígeno y en el tamaño de las partículas resultantes de matriz proteica. Todas estas características influyen en la inmunogenicidad de las composiciones vacunales de matriz proteica de la presente divulgación.

La frase “reducir una base de Schiff” se refiere a exponer azometina o un compuesto de fórmula  $R_1R_2C=N-R_3$  (donde  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son subestructuras químicas que contienen normalmente átomos de carbono) a un agente reductor que sature el doble enlace de la base de Schiff con átomos de hidrógeno. Los métodos de reducción química son conocidos por los especialistas en la materia.

Tal como se emplea aquí, la frase “se une específicamente”, haciendo referencia a un anticuerpo o a un fragmento del mismo, significa una mayor afinidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo por un antígeno en particular, como p.ej. una proteína o segmento de la misma, respecto a una cantidad igual de cualquier otro antígeno. Es deseable que la afinidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo por su antígeno sea al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces o 100 veces mayor que por una cantidad igual de cualquier otro antígeno, incluyendo los antígenos análogos, según una determinación por métodos estándar, como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Por “sujeto” se entiende un animal susceptible de ser infectado por un microbio. Es de esperar que un sujeto sea un mamífero tal como un humano, mono, perro, gato, ratón, rata, vaca, oveja, cabra o caballo. Un sujeto humano puede ser un adulto, un bebé, un niño pequeño, un niño mayor o un niño prepubescente.

Un “antígeno independiente de células T” se refiere a un antígeno que induce la formación de anticuerpos sin la ayuda de linfocitos T efectoros. El antígeno independiente de células T puede estimular directamente los linfocitos B sin la cooperación de los linfocitos T. Como ejemplos adecuados de antígenos independientes de células T cabe mencionar el antígeno capsular poli(ácido-gamma-D-glutámico) (PGA), el ácido alginico (alginato), el dextrano, los polisacáridos (PS), los poliaminoácidos, los polialcoholes y los ácidos nucleicos.

Los términos “vacuna”, “composición vacunal” y “composición inmunógena” se usan aquí para referirse a cualquier composición que contiene un antígeno útil, el cual, una vez administrado a un sujeto vertebrado, induce una respuesta inmune del sujeto a dicho antígeno. Aunque un objetivo de la presente invención es proporcionar vacunas capaces de

provocar una respuesta inmune protectora (es decir, capaz de proteger a un sujeto vacunado contra un patógeno que lleva naturalmente el antígeno incluido en la vacuna), la inmunización protectora, p.ej. después de una administración única, no es una cualidad inherente al término "vacuna" o "composición vacunal" tal como se usa aquí.

5 Las composiciones vacunales de matriz proteica de la presente revelación no requieren un enlace covalente entre el antígeno destinado a provocar una respuesta inmune y la proteína transportadora y/o el policonjugado usados para formar la matriz. Esto simplifica ventajosamente la preparación de composiciones vacunales de matriz proteica, reduciendo el coste de su producción en comparación con la tecnología de las vacunas conjugadas. Las vacunas conjugadas de polisacárido (PS)-proteína han resultado ser prohibitivamente caras de producir y vender en el mundo en desarrollo.  
10 Las vacunas conjugadas usuales son difíciles de producir a bajo coste debido a la química altamente especializada requerida para cada vacuna y a los costes de producción y purificación, tanto del antígeno PS como de la proteína transportadora.

15 Las composiciones vacunales según la presente revelación abordan la necesidad de vacunas que puedan inducir la inmunidad de manera segura contra antígenos anteriormente intratables. Las composiciones vacunales descritas aquí pueden ser monovalentes (que tienen un único antígeno para inducir una respuesta inmunitaria) o multivalentes (que tienen múltiples antígenos para inducir una respuesta inmunitaria múltiple).

20 El significado de otros términos se entenderá por el contexto en el que aparecen o según lo entienden los especialistas en la materia, incluyendo los profesionales de química orgánica, farmacología, microbiología, bioquímica de proteínas e inmunología.

25 En este documento se revela una composición inmunógena que lleva (1) uno o más antígenos útiles, (2) una o más proteínas transportadoras y (3) uno o más policonjugados, en la cual dicha proteína transportadora y/o dicho policonjugado están reticulados formando una matriz proteica y dicho antígeno útil está atrapado en dicha matriz proteica. Dichas composiciones se pueden preparar fácilmente mezclando el antígeno, la proteína transportadora y los componentes policonjugados, y luego iniciando una reacción para que reticule la proteína transportadora y/o el policonjugado. En el método de producción de la vacuna de matriz proteica puede variar el orden de adición de los componentes, pero en general, si se forma una matriz proteica reticulada antes de la adición del antígeno útil, el atrapamiento deseado no tiene lugar y el antígeno permanece disociado. Preferiblemente, el policonjugado y el antígeno polisacárido se incuban juntos, luego se añade el agente reticulante y a continuación la proteína transportadora (que forma la matriz). Las composiciones vacunales de matriz proteica de la presente revelación que llevan un policonjugado, p.ej.  $\alpha$ -PLL, mejoran el atrapamiento de antígenos en la matriz proteica, con un consiguiente aumento de la inmunogenicidad respecto al antígeno solo o a las composiciones vacunales de matriz proteica que no llevan un policonjugado.  
35

40 La presente revelación presenta en particular composiciones vacunales de matriz capsular proteica que contienen un policonjugado, y métodos para preparar y administrar dichas composiciones, con el fin de proporcionar inmunidad contra los antígenos, en concreto contra los antígenos independientes de células T o contra los antígenos que normalmente inducen unas respuestas inmunitarias débiles, como p.ej. los polisacáridos (PS), los polialcoholes, los poliaminoácidos y otros polímeros orgánicos. Las composiciones vacunales de la presente divulgación tienen las potentes propiedades inmunológicas típicas de las vacunas conjugadas de PS-proteína, pero difieren convenientemente de éstas en que no requieren ningún enlace atómico covalente significativo para acoplar el antígeno útil, p.ej. PS o un polímero orgánico capsular, a la proteína transportadora/policonjugado. En cambio el antígeno útil, p.ej. PS o polímeros orgánicos capsulares, está atrapado en la matriz de proteína transportadora/policonjugado. Así, por ejemplo, se puede formar una matriz proteica mediante la reticulación covalente de moléculas de proteína transportadora entre sí, con otras moléculas de proteína transportadora y/o con el policonjugado, en presencia de un antígeno soluble, p.ej. PS o polímeros orgánicos capsulares. Las proteínas transportadoras y/o los policonjugados altamente reticulados entre sí pueden formar una matriz capaz de capturar (atrapar) un antígeno y facilitar la captación de este antígeno por las células presentadoras de antígeno, con lo cual se estimula la producción de anticuerpos por las células B. Como se demuestra aquí, el nivel de atrapamiento de antígenos en la matriz se incrementa añadiendo un policonjugado, por ejemplo poli-L-lisina, que mejora los rendimientos de las partículas de PCMV y a su vez aumenta la inmunogenicidad de las composiciones de PCMV en comparación con el antígeno solo o con los complejos de antígeno/matriz proteica formados sin el uso de un policonjugado.  
50

55 Conceptualmente, la matriz de la proteína transportadora/policonjugado se puede visualizar como una "malla" que encierra el antígeno o como una serie de "cuentas de un hilo" donde, según esta analogía, el antígeno es el "hilo" y la proteína o los complejos reticulados de proteína/policonjugado son las "cuentas". El antígeno es atrapado en la matriz de proteína transportadora/policonjugado si la proteína transportadora rodea al antígeno, formando un anillo alrededor del antígeno o una malla tridimensional en la cual se enreda el antígeno. Como resultado del atrapamiento, una cantidad deseable del antígeno se asocia con un vehículo antigénico sin que tenga lugar una reticulación significativa para unir el antígeno por enlace covalente a la proteína transportadora. Una cantidad suficiente de antígeno, y/o su asociación persistente con el vehículo gracias al atrapamiento, permite que las vacunas de matriz proteica tengan una mejor inmunogenicidad en comparación con la inmunización con el antígeno solo o con el antígeno simplemente mezclado con una proteína transportadora. Se ha demostrado que las composiciones vacunales de matriz proteica según la presente revelación alcanzan una inmunogenicidad comparable con las vacunas conjugadas comercialmente disponibles, en las cuales el antígeno está unido covalentemente a un vehículo.  
65

Preferiblemente las moléculas de proteína transportadora y/o de policación están reticuladas con enlaces covalentes. Por ejemplo, un enlace covalente puede consistir en un enlace peptídico entre un grupo amino primario de una cadena lateral de lisina (p.ej. en poli-L-lisina) y un grupo carboxi de una cadena lateral de aspartato o glutamato (p.ej. en una proteína transportadora). Las reticulaciones covalentes pueden iniciarse preferiblemente usando agentes reticulantes tales como los compuestos de fórmula  $\text{OHC-R-CHO}$ , donde R es un grupo alquileo divalente lineal o ramificado de 1 hasta 12 átomos de carbono, un grupo heteroalquilo divalente lineal o ramificado de 1 hasta 12 átomos, un alquenoileno divalente lineal o ramificado de 2 hasta 12 átomos de carbono, un alquinoileno divalente lineal o ramificado de 2 hasta 12 átomos de carbono, un radical aromático divalente de 5 hasta 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 hasta 10 átomos,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$  en el cual q es 1 hasta 4 o un enlace químico directo que une dos grupos aldehído., El enlace covalente se forma preferiblemente utilizando glutaraldehído como agente reticulante o, como alternativa, agentes tales como el éster m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida o bencidina bis-biazotizada, bis-[sulfosuccinimidil] suberato o adipimidato de dimetilo. Aunque la formación de una composición vacunal de matriz proteica no lo requiere, el antígeno útil puede estar unido covalentemente a la proteína transportadora, por ejemplo hasta un nivel incidental en la formación de la matriz de proteína transportadora reticulada, debido p.ej. a grupos reactivos desbloqueados o a grupos amino o carboxilo terminales o a grupos hidroxilo que pueda haber en el antígeno. En general la unión covalente del antígeno al vehículo no es un objetivo en la formación de vacunas de matriz proteica. Para los fines de la presente invención, las vacunas de matriz proteica son composiciones vacunales en las cuales no hay más de un 50% de antígeno unido covalentemente a la proteína transportadora. El nivel de reticulación incidental del antígeno se puede calcular estequiométricamente teniendo en cuenta la proporción de sitios en el antígeno que pueden tomar parte en una reacción de reticulación, es decir, teniendo en cuenta los grupos reactivos del reticulante o reticulantes empleados, la cantidad de reactivo(s) y de otros reactantes (p.ej. de proteína transportadora, policación) utilizados, y si se dejan completar las reacciones de reticulación (p.ej. si se consume todo el reactivo reticulante durante la reacción). La cantidad de antígeno reticulado en una composición vacunal de matriz proteica también puede medirse p.ej. analizando por espectrometría de masas las reticulaciones de carbohidratos/lisina en una composición de PCMV.

Preferiblemente el antígeno y la matriz de proteína transportadora/policación no están asociados covalentemente. Esta asociación no covalente puede consistir en una interacción hidrófoba, una interacción iónica, una interacción de van der Waals o en enlaces de hidrógeno; o el antígeno puede estar encerrado física o estéricamente dentro de la matriz proteica, de manera que se evite o retrase la disociación del antígeno de la matriz. La asociación no covalente puede incluir configuraciones físicas de formas geométricas que asocien el antígeno sin uniones covalentes (atrapen) a los complejos de proteínas (es decir, como en la anterior analogía de las "cuentas de un hilo").

Las composiciones vacunales según la presente descripción se pueden preparar empleando cualquiera de los muchos posibles conectores para reticular cualquiera de las muchas posibles proteínas transportadoras y/o politaciones, en presencia de cualquier antígeno útil. En el presente documento se analizan los ejemplos preferidos de conectores, proteínas transportadoras, politaciones y antígenos útiles.

Los polisacáridos (PS) son polímeros de los sacáridos (azúcares). Los PS procedentes de las cápsulas microbianas son los componentes antigénicos primarios involucrados en la inmunidad protectora contra patógenos bacterianos encapsulados como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella Typhi* y *Haemophilus influenzae* de tipo B. La inmunización de adolescentes y adultos con vacunas basadas en polisacáridos microbianos ha tenido éxito disminuyendo la incidencia de la enfermedad, pero no ha sido tan eficaz a la hora de proporcionar una inmunidad protectora a bebés y niños pequeños (es decir, a niños menores de 24 meses de edad). Los niños pequeños aún no han alcanzado la madurez de un repertorio inmune adaptativo y los antígenos independientes de las células T, como los PS capsulares, son poco inmunógenos y no inducen respuestas inmunitarias protectoras duraderas (es decir, una respuesta de memoria inmunológica) en estos jóvenes receptores de vacunas.

Un antígeno independiente de células T, tal como un polisacárido, se puede convertir en un antígeno dependiente de células T por acoplamiento químico del polisacárido a una proteína. Este proceso, conocido como "conjugación", implica la formación de enlaces covalentes entre los átomos de la estructura del polisacárido y los átomos de la cadena lateral de los aminoácidos presentes en la proteína "transportadora". Estas "vacunas conjugadas" promueven más eficientemente la inducción de la maduración de las células B y el cambio de isotipo, dando lugar a niveles mucho más altos de anticuerpos con el perfil protector anti-PS correcto. Los anticuerpos protectores tienen una gran afinidad por sus antígenos polisacáridos y en general pertenecen a la subclase de la inmunoglobulina G (IgG), un anticuerpo de larga duración con actividad efectora de fijación y opsonización del complemento.

En general un antígeno independiente de células T no estimula una inmunidad duradera, es decir, la producción de anticuerpos IgG, pero puede estimular la producción de anticuerpos IgM menos potentes, de fijación más débil y más temporales. Como tales, los antígenos polisacáridos solos no suelen inducir respuestas inmunitarias secundarias de IgG. Sin embargo, los polisacáridos sí inducen respuestas inmunitarias secundarias cuando la inmunización primaria se realiza con un conjugado de PS-proteína, porque las células de memoria inducidas por el conjugado ya han sido programadas para producir IgG. De hecho se cree que la respuesta inmunitaria secundaria en el caso de los animales o humanos vacunados imita la respuesta protectora provocada por la exposición a un microbio que presenta el PS; esta memoria a largo plazo es fundamental para que una vacuna funcione proporcionando una inmunidad protectora a los sujetos inmunizados, años después de su inmunización. Por lo tanto, los conjugados de PS-proteína se valoran por (1) su capacidad de inducir altos niveles de IgG contra los antígenos PS y (2) su capacidad de inducir respuestas

inmunitarias de memoria contra los antígenos PS. Los antígenos polisacáridos solos no presentan en general estas propiedades y por consiguiente son antígenos inferiores. La dificultad para sintetizar vacunas conjugadas y su coste de producción ha ralentizado el desarrollo de vacunas conjugadas para muchas enfermedades bacterianas a las que se busca una respuesta inmunitaria protectora contra un antígeno polisacárido.

5 Otros antígenos independientes de las células T incluyen homopolímeros de aminoácidos como el poli(ácido-gamma-D-glutámico) (PGA) y los polialcoholes. La mayoría de los biopolímeros son antígenos independientes de células T. Los polímeros pueden reticular los receptores de inmunoglobulina (Ig) en las células B que los reconocen debido a la naturaleza repetitiva de sus estructuras químicas (y por tanto de epítomos). Por lo tanto, los polímeros pueden activar las células B para la producción de IgM antipolímero del mismo modo que lo hacen los polisacáridos. Por ejemplo, un homopolímero de aminoácido, el poli(ácido-gamma-D-glutámico) (PGA) de *Bacillus anthracis*, es un polímero capsular poco inmunógeno y también un antígeno independiente de células T. Las vacunas compuestas de PGA conjugadas con vehículos proteicos son muy inmunógenas y capaces de inducir IgG anti-PGA y memoria inmunológica al PGA. Por lo tanto, la mayoría de los polímeros responden como los PS en cuanto a su inmunogenicidad, porque no pueden ser procesados y presentados por moléculas CMH-II y por consiguiente no pueden reclutar la ayuda de las células T. Se encuentra una excepción en algunos polímeros naturales que interactúan con otra clase de receptores llamados receptores tipo Toll (TLR). Una vez activados, los TLR pueden inducir la producción de citocinas por parte de las células huésped y producir cambios en la respuesta inmune adaptativa. Algunos PS están unidos covalentemente a los ligandos de TLR o contaminados con estos ligandos. Por ejemplo, los lipopolisacáridos (LPS) son PS altamente inmunógenos e inducen respuestas de IgG y de memoria; El resto lipídico A de LPS es un ligando de TLR y puede ser responsable de las propiedades inmunológicas.

Las vacunas conjugadas convencionales son difíciles de producir económicamente debido a los costes de producción y purificación, tanto del antígeno PS como de la proteína transportadora, y a la química específica involucrada en cada conjugación de polisacárido-proteína. Usualmente ambos componentes deben ser totalmente puros antes de que la conjugación química pueda realizarse con una eficiencia de acoplamiento razonable. Normalmente debe desarrollarse específicamente para varios PS una química de acoplamiento que es única para la química de los PS y las proteínas transportadoras que se han seleccionado. Esta química de acoplamiento introduce grupos funcionales en el PS, que luego se pueden unir a la proteína transportadora, normalmente mediante las cadenas laterales épsilon amino de los restos de lisina. La modificación química del PS para introducir dichos grupos de acoplamiento puede destruir epítomos en el PS e introducir nuevos epítomos (p.ej. asociados con el conector o con los grupos sacáridos modificados) cuya importancia solo puede evaluarse con un análisis inmunológico cuidadoso. Además, para las vacunas conjugadas de PS-proteína usuales, el tamaño del PS, el número de moléculas de PS unidas por molécula de proteína transportadora, la naturaleza del vehículo escogido y el tipo de enlaces químicos pueden influir en la inmunogenicidad de la vacuna conjugada. Así, por ejemplo, en el caso de la enfermedad neumocócica, donde cada uno de los más de 90 serotipos conocidos tiene una estructura de PS diferente (Bentley y otros, PLOS Genetics 2(3):e31 262-269, 2006), un solo método de conjugación no es apropiado para todos los serotipos. La síntesis reproducible de vacunas conjugadas con propiedades inmunológicas reproducibles implica un control cuidadoso del tamaño del PS, del número de moléculas de PS unidas por cada molécula transportadora de proteína, de la naturaleza del vehículo seleccionado y del tipo de enlaces químicos, lo cual a su vez aumenta dramáticamente el coste de producción de las vacunas conjugadas.

La aparición de la resistencia a los antibióticos pone de relieve la urgencia de desarrollar vacunas seguras y eficaces. Para que las vacunas estén generalmente disponibles, sobre todo para los que viven en países en desarrollo, también es necesario que la producción de vacunas sea rentable. La incorporación de vacunas conjugadas combinadas contra muchos antígenos polisacáridos procedentes de diferentes serotipos de una o más especies bacterianas al régimen de inmunización infantil simplificaría la administración de la vacuna en esta población de alto riesgo. Sin embargo, la tecnología actual de vacunas conjugadas no es rentable y por consiguiente las vacunas conjugadas combinadas son casi imposibles de suministrar al mundo en desarrollo debido a su alto coste.

50 Las composiciones vacunales inmunógenas son preferiblemente vacunas de matriz capsular proteica (PCMV) en que uno o más componentes capsulares bacterianos están atrapados en una matriz reticulada de proteína transportadora y/o polimerización. Las PCMV se pueden producir más fácilmente que las conjugadas porque el antígeno útil, como p.ej. los polisacáridos de la cápsula bacteriana, no necesita ser hidrolizado en fragmentos más pequeños y en una matriz proteica pueden atraparse simultáneamente múltiples antígenos.

55 Como el método para producir las vacunas de la presente invención no requiere ningún conocimiento de la química del antígeno útil, p.ej. un polisacárido capsular, el método no depende de la necesidad de desarrollar una química de reticulación que sea compatible con la química del antígeno útil y de la proteína transportadora. Aunque es posible que algunos antígenos puedan interactuar con el reticulante, esto no debe restar valor a la eficacia de la vacuna, pues es de esperar que la reticulación involuntaria del antígeno útil y de la proteína transportadora dé lugar a propiedades inmunógenas similares a los conjugados. Sin embargo, en las vacunas según la presente invención, la reticulación del antígeno útil para la proteína transportadora no es un requisito para que la vacuna sea inmunológicamente eficaz. Esto contrasta notablemente con las vacunas conjugadas convencionales. Es conveniente que las vacunas de la presente invención tengan al menos, p.ej., el 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o incluso el 100% de las proteínas transportadoras reticuladas y no más de, p.ej., el 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o el 1% del antígeno útil reticulado con la proteína transportadora. Es conveniente que no más del 10% de los

antígenos estén reticulados con las proteínas transportadoras y que al menos el 50% de las proteínas transportadoras están reticuladas.

5 Como se ha expuesto aquí, las composiciones vacunales de matriz proteica que incorporan un polímero tienen mayor  
 10 atrapamiento de antígenos y una correspondiente inmunogenicidad superior en comparación con las composiciones  
 que llevan el antígeno solo, con las simples mezclas de antígeno/vehículo e incluso con las composiciones vacunales  
 de matriz antígeno/proteína que no incorporan un polímero según lo revelado aquí. Como ya se ha dicho, las cápsulas  
 polisacáridas de las bacterias están compuestas por azúcares repetitivos, y muchas cápsulas bacterianas patógenas  
 15 están cargadas negativamente. La carga negativa puede contribuir a evitar la fagocitosis por las células inmunes del  
 huésped mediante la repulsión de la carga o la presentación de una cápsula inhibitoria más grande. Weinger y otros,  
 PLoS Pathogens, 5: 1-9 (2009). Esta misma repulsión de carga también puede tener lugar con la(s) proteína(s) de la  
 matriz, menoscubando como consecuencia el atrapamiento del polisacárido. Para contrarrestar esta carga negativa  
 se puede agregar un polímero, por ejemplo poli-L-lisina (PLL), a las reacciones de PCMV. Por ejemplo, tal como se  
 ha expuesto aquí, la adición de un 0,04% de  $\alpha$ -PLL a la reacción de PCMV de Vi-CRM197 incrementó el atrapamiento  
 del polisacárido Vi desde un 5% hasta > 20% (figura 1).

El control del tamaño de partícula puede mejorar la inmunogenicidad de las vacunas de matriz proteica. En las formas  
 de ejecución adecuadas de la presente invención, el complejo antígeno/matriz de proteína transportadora/polímero  
 20 tiene un tamaño medio de partícula superior a 50 nm de diámetro. Las partículas del tamaño apropiado se pueden  
 fraccionar por cualquier medio adecuado, incluyendo la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), seguido de la  
 agrupación de las partículas de mayor tamaño y la eliminación de las partículas de menor tamaño y/o del polisacárido  
 no atrapado. Como alternativa se podrían usar membranas filtrantes con límites de peso molecular bien elegidos para  
 eliminar las partículas de menor tamaño y retener las partículas del tamaño deseado. La eliminación de especies de  
 25 peso molecular más bajo (p.ej. las especies de diámetro < 50 nm) o una selección de tamaños de partícula de la matriz  
 proteica de la composición, que incluya tamaños de partículas superiores por lo menos a 50 nm de diámetro, se puede  
 lograr por cualquier medio conocido del estado técnico, como por ejemplo cromatografía, incluyendo la cromatografía  
 de exclusión de tamaños (SEC), la cromatografía de filtración en gel, o la cromatografía de permeación en gel. También  
 se podrían emplear técnicas de electroforesis en gel.

30 Los métodos de producción de vacunas aquí descritos no provocan una modificación extensa del antígeno útil, como  
 p.ej. un polímero capsular. El antígeno permanece generalmente en el mismo estado, con una posible modificación  
 consistente p.ej. en la disminución de azúcares reductores de las cápsulas de PS que llevan dichos grupos al final de  
 las cadenas poliméricas. Es improbable que estas modificaciones menores alteren la inmunogenicidad de la mayoría  
 de los PS capsulares, porque los azúcares finales son 100-10.000 veces menos abundantes que los restos internos  
 35 en el polímero. En cambio, para las vacunas conjugadas convencionales es generalmente necesario introducir grupos  
 conectores en el antígeno, p.ej. en un polímero capsular, que sirvan como el punto de unión covalente de la proteína  
 transportadora. Por ejemplo, la introducción de grupos reactivos en un PS puede provocar la destrucción de epítopos  
 capsulares y la generación de nuevos epítopos que serían indeseados en un producto vacunal por desconocimiento  
 de su reactividad reticulante inmunológica con auto-epítopos del huésped.

40 Los métodos de producción de vacunas aquí descritos son menos complejos que la tecnología de vacunas conjugadas  
 porque su química solo depende de la química de reticulación de la proteína transportadora (p.ej. DNI, subunidad B  
 de la toxina del cólera, toxoide diftérico, toxoide tetánico o fragmento C, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*) y/o  
 del polímero (p.ej.  $\alpha$ -poli-L-lisina y  $\epsilon$ -poli-L-lisina). Por ejemplo, aunque el polímero capsular influye en la velocidad de  
 45 reticulación cuando se mezcla con DNI, no afecta al patrón o al alcance de la reticulación, que se rigen más por la  
 proteína empleada, por su concentración y por la concentración del agente reticulante (p.ej. glutaraldehído) añadido.  
 Estos parámetros son fáciles de ajustar, lo cual reduce el tiempo y el esfuerzo necesarios para producir la vacuna y  
 ahorra gastos.

50 Los métodos para preparar las composiciones de PCMV aquí descritas se pueden usar con cualquier antígeno, p.ej.  
 con un polímero capsular o cualquier biopolímero que lleve pocos grupos amino, si los tiene, y con cualquier proteína  
 transportadora y/o polímero reticulables, p.ej. con proteínas transportadoras sin epítopos críticos que puedan quedar  
 destruidos tras la reticulación o reducción química. Es conveniente que las proteínas transportadoras utilizables en los  
 métodos aquí descritos tengan al menos 2 restos de lisina u otros restos que estén desbloqueados y puedan reticularse  
 55 por modificación química. El toxoide tetánico es una posible proteína transportadora. Esta toxina se vuelve no tóxica  
 por tratamiento con formaldehído, una sustancia que reacciona con los grupos amino de las proteínas. Otras proteínas  
 transportadoras idóneas son la subunidad B de la toxina del cólera (suministrada por SBL Vaccin AB), el toxoide  
 diftérico o CRM197, el toxoide tetánico o fragmento C (suministrado por Sigma Aldrich), el DNI o la beta-galactosidasa  
 de *Escherichia coli* (suministrada por Sigma Aldrich).

60 Las actuales vacunas conjugadas multivalentes se preparan sintetizando primero vacunas conjugadas individuales,  
 que luego se mezclan para producir una vacuna conjugada "cóctel" (como p.ej. la vacuna neumocócica heptavalente  
 de Wyeth, Prevnar®7; la vacuna neumocócica 10-valente Synflorix®, de GlaxoSmithKline; y la vacuna 13-valente de  
 Pfizer, Prevnar®13). Los métodos de la presente invención para producir vacunas pueden usarse para hacer vacunas  
 65 multivalentes mezclando antígenos químicamente diferentes, p.ej. polímeros orgánicos capsulares, antes de reticular  
 la proteína portadora y/o el polímero, p.ej. con glutaraldehído u otro agente reticulante, o bien mezclando vacunas

específicas de la presente invención que se habían sintetizado por separado. Esta flexibilidad ofrece unas ventajas importantes sobre los métodos usuales de producción de vacunas multivalentes, que deberían reducir notablemente el coste de los productos.

5 Las vacunas de la presente invención analizadas en los ejemplos tuvieron un rendimiento comparable a las vacunas conjugadas, aunque estas vacunas se sintetizaron por un método que no prevé la generación de enlaces covalentes entre las moléculas de antígeno y la proteína transportadora. El glutaraldehído reacciona principalmente con cadenas laterales amino de proteínas tipificadas por el grupo épsilon amino de los restos de lisina. Los antígenos polisacáridos no reaccionan prácticamente con glutaraldehído y otros reactivos con grupos funcionales aldehído, porque contienen pocos grupos amino libres (cualquier cadena lateral amínica suele estar acetilada) para reaccionar con glutaraldehído o reticulantes con grupos funcionales aldehído (p.ej. OCH-R-CHO, expuesto arriba). Por lo tanto dichos antígenos son muy adecuados para la formación de PCMV, en las cuales menos del 50% del antígeno está reticulado directamente con una proteína transportadora. Como se vio en los ejemplos siguientes, las respuestas inmunes inducidas por las PCMV, que se compararon favorablemente con los controles a base de conjugados, indican que las moléculas de PS estaban atrapadas molecularmente en una matriz reticulada de moléculas de proteína DNI.

De acuerdo con un modelo no limitativo, el atrapamiento sirve para pasar la composición vacunal de matriz proteica a las células B, las cuales se unen a dichas matrices mediante los receptores de Ig que reconocen el antígeno polimérico. Una vez absorbidas en el interior de estas células B, las matrices se degradan análogamente a las vacunas conjugadas convencionales, dando como resultado péptidos derivados de la proteína transportadora que son presentados sobre las moléculas CMH de clase II de las células B, reclutando a su vez células T efectoras y promoviendo por tanto la expansión y maduración de dichas células B para convertirse en células plasmáticas productoras de IgG con "memoria" específica para el antígeno. Por consiguiente según el modelo no limitativo las PCMV actúan inmunológicamente como vacunas capsulares de conjugados de proteína, pero se diferencian en que las PCMV carecen de enlaces covalentes significativos entre la proteína transportadora y los polímeros capsulares.

Las composiciones vacunales de la presente revelación, incluyendo las PCMV, se pueden utilizar combinadas, por ejemplo en vacunas pediátricas. Las vacunas de la presente invención se pueden utilizar asimismo para vacunar, por ejemplo, contra la infección neumocócica, la infección estreptocócica (grupos A y B), la infección por *Haemophilus influenzae* tipo B ("HiB"), la infección meningocócica (p.ej. por *Neisseria meningitides*), y se pueden usar como vacunas de antígeno O de bacterias Gram negativas (p.ej. *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* (Thirumalapura y otros, J. Med. Microbiol. 54:693-695, 2005; Vinogradov y Perry, Carbohydr. Res. 339:1643-1648, 2004; Vinogradov y otros, Carbohydr. Res. 214: 289-297, 1991), de especies de *Shigella*, de especies de *Salmonella*, de especies de *Acinetobacter*, de especies de *Burkholderia* y de especies de *Escherichia coli*.

Las vacunas de la presente invención se pueden preparar utilizando cualquier conector, como p.ej. los aquí descritos, para reticular cualquier proteína transportadora y/o cualquier policación, como p.ej. los aquí descritos, en presencia de uno o más antígenos útiles, como p.ej. los aquí descritos. Cuando se usa un solo antígeno útil se dice que la vacuna de matriz proteica de la presente invención es monovalente. Si se usa más de un antígeno útil, se dice que la vacuna de matriz proteica de la presente invención es multivalente. Si el antígeno útil es un polímero o polisacárido capsular microbiano, se dice que la vacuna de matriz proteica de la presente invención es una vacuna de matriz capsular proteica (PCMV).

#### Conectores

Los agentes reticulantes que sirven para reticular proteínas transportadoras y/o polificaciones son bien conocidos en el estado técnico e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

Los métodos generales y los segmentos para reticular directamente las proteínas transportadoras usando un conector homobifuncional o heterobifuncional están descritos p.ej. por GT Hermanson, Bioconjugate Techniques (Academic Press, 1996) y Dick y Beurret, "Glycoconjugates of Bacterial Carbohydrate Antigens [*Glicoconjugados de antígenos carbohidratos bacterianos*]" en Conjugate Vaccines [*Vacunas conjugadas*] (Cruse y Lewis, eds.) (Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger, 1989), vol.10, págs. 48-114. Por ejemplo, en una proteína transportadora que tenga un número 'n' de restos de lisina hay teóricamente 'n + 1' aminas primarias (incluyendo la amina terminal) disponibles para reaccionar por ejemplo con un grupo carboxilo del reticulante. Así, al emplear este procedimiento de conjugación directa, el producto se limita a la formación de 'n + 1' enlaces amida.

En su forma más simple, el conector empleado preferiblemente en la presente revelación es un enlace que une dos proteínas transportadoras, un enlace que une dos polificaciones, un enlace que une dos sitios de la misma proteína transportadora o policación, o un enlace que une proteínas transportadoras y polificaciones. El conector puede tener un esqueleto molecular lineal, cíclico o ramificado con grupos laterales que se unan por enlace covalente a dos proteínas transportadoras y/o polificaciones, (A) y (B). Cualquier proteína transportadora determinada se puede unir a más de una proteína transportadora y/o a una policación, creando una matriz de proteínas transportadoras/polificaciones conectadas entre sí, en la cual se puede atrapar un antígeno útil.

El término "grupo de enlace" se refiere al enlace covalente resultante de la combinación de segmentos reactivos del conector (L) con grupos funcionales de (A) o (B). Como ejemplos de grupos de enlace cabe citar, sin limitaciones: éster, carbamato, tioéster, imina, disulfuro, amida, éter, tioéter, sulfonamida, isourea, isotiourea, imidoéster, amidina, fosforamido, fosfodiéster, tioéter e hidrazona.

El enlace de (A) con (B) se logra por covalencia, que consiste en la formación de un enlace (grupo de enlace) con uno o más grupos funcionales existentes en (A) y (B). Los ejemplos de grupos funcionales químicamente reactivos que se pueden emplear con esta finalidad incluyen, sin limitaciones, grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo, carbonilo, tioésteres, guanidinilo, imidazolilo y fenólicos, todos ellos presentes en aminoácidos que forman parte naturalmente de muchas proteínas transportadoras

Por lo tanto la unión covalente de (A) con (B) se puede realizar utilizando un conector (L) que contenga segmentos reactivos capaces de reaccionar con dichos grupos funcionales existentes en (A) y (B). El producto de esta reacción es un grupo de enlace que contiene los enlaces recién formados que unen (L) con (A) y (L) con (B). Por ejemplo, un grupo hidroxilo de (A) puede reaccionar con un grupo ácido carboxílico de (L) o con un derivado activado del mismo, véase más abajo, formando un grupo de enlace éster.

Los ejemplos de segmentos capaces de reaccionar con grupos sulfhidrilo incluyen compuestos de  $\alpha$ -haloacetilo del tipo  $XCH_2CO-$  (donde  $X = Br, Cl$  o  $I$ ), que tienen una reactividad particular con los grupos sulfhidrilo, pero también se pueden usar para modificar grupos imidazolilo, tioéter, fenol y amino, tal como está descrito, por ejemplo, en Gurd, *Methods Enzymol.*, 11:532 (1967). Los derivados de N-maleimida también se consideran selectivos hacia los grupos sulfhidrilo, pero además pueden servir para el acoplamiento con grupos amino bajo ciertas condiciones. Los reactivos como el 2-iminotiolano (Traut y otros, *Biochemistry*, 12:3266 (1973)), que introducen un grupo tiol por conversión de un grupo amino, se pueden considerar reactivos de sulfhidrilo si el enlace tiene lugar mediante la formación de puentes disulfuro.

Los ejemplos de segmentos reactivos capaces de reaccionar con los grupos amino incluyen, por ejemplo, agentes de alquilación y acilación. Los agentes de alquilación representativos incluyen:

- (i) compuestos de  $\alpha$ -haloacetilo que muestran especificidad hacia grupos amino en ausencia de grupos reactivos tiol y que son del tipo  $XCH_2CO-$  (donde  $X = Cl, Br$  o  $I$ , como los descritos, por ejemplo, por Wong (*Biochemistry*, 24:5337 (1979));
- (ii) derivados de N-maleimida capaces de reaccionar con grupos amino mediante una reacción del tipo Michael o por acilación mediante su adición al grupo carbonilo del anillo, como describen, por ejemplo, Smyth y otros (*J. Am. Chem. Soc.*, 82:4600, 1960 y *Biochem. J.*, 91:589 (1964));
- (iii) haluros de arilo tales como los compuestos nitrohaloaromáticos reactivos;
- (iv) haluros de alquilo como los descritos, por ejemplo, por McKenzie y otros (*J. Protein Chem.*, 7:581 (1988));
- (v) aldehídos y cetonas capaces de formar bases de Schiff con grupos amino, de modo que los aductos resultantes suelen estabilizarse por reducción para obtener una amida estable;
- (vi) derivados epoxidicos tales como la epiclorohidrina y los bisoxiranos, que pueden reaccionar con grupos amino, sulfhidrilo o hidroxilo fenólicos;
- (vii) derivados clorados de s-triazinas, que son muy reactivos con grupos nucleófilos tales como amino, sulfhidrilo o hidroxilo;
- (viii) aziridinas basadas en los compuestos de s-triazina anteriormente detallados, como las descritas, por ejemplo, por Ross (*J. Adv. Cancer Res.*, 2:1 (1954)), capaces de reaccionar con grupos nucleófilos tales como amino por apertura del anillo;
- (ix) ésteres de dietilo del ácido escuárico tales como los descritos, por ejemplo, por Tietze (*Chem. Ber.*, 124:1215 (1991)); y
- (x) éteres de  $\alpha$ -haloalquilo, que son unos agentes de alquilación más reactivos que los haluros de alquilo normales por la activación debida al átomo de oxígeno del éter, tales como los descritos, por ejemplo, por Benneche y otros (*Eur. J. Med. Chem.*, 28:463 (1993)).

Como agentes de acilación representativos que reaccionan con grupos amino cabe mencionar:

- (i) isocianatos e isotiocianatos, en particular los derivados aromáticos que forman derivados estables de urea y de tiourea respectivamente;
- (ii) cloruros de sulfonilo, que han sido descritos, por ejemplo, por Herzig y otros (*Biopolymers*, 2:349 (1964));
- (iii) haluros de acilo;
- (iv) ésteres activos tales como los ésteres de nitrofenilo o de N-hidroxisuccinimidilo;
- (v) anhídridos de ácido tales como los mixtos, simétricos o los N-carboxianhídridos;
- (vi) otros reactivos útiles para la formación de enlaces amido, como los descritos, por ejemplo, por M. Bodansky (*Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, 1984);
- (vii) acilazidas, en las que p.ej. el grupo azida se genera a partir de un derivado de hidrazida formado previamente con el uso de nitrito sódico, como las descritas, por ejemplo, por Wetz y otros (*Anal. Biochem.*, 58:347 (1974)); y
- (viii) imidoésteres que forman amidinas estables por reacción con grupos amino, como los descritos, por ejemplo, por Hunter y Ludwig (*J. Am. Chem. Soc.*, 84:3491 (1962)).

Los aldehídos, tales como p.ej. el glutaraldehído, y las cetonas, pueden reaccionar con aminas para formar bases de Schiff, que pueden estabilizarse ventajosamente por aminación reductora. Los segmentos de alcoxilamino reaccionan fácilmente con cetonas y aldehídos para producir alcoxiaminas estables, tal como han descrito, por ejemplo, Webb y otros (Bioconjugate Chem., 1:96 (1990)).

Los ejemplos de segmentos reactivos capaces de reaccionar con grupos carboxilo incluyen compuestos diazo tales como los ésteres de diazoacetato y las diazoacetamidas, que reaccionan muy específicamente formando grupos éster, tal como describe, por ejemplo, Herriot (Adv. Protein Chem., 3:169 (1947)). Asimismo se pueden emplear reactivos modificadores de ácido carboxílico tales como las carbodiimidias, que reaccionan mediante la formación de O-acilurea seguida de la formación de enlaces amida.

Si se desea, los grupos funcionales de (A) y/o (B) pueden convertirse en otros grupos funcionales antes de la reacción, por ejemplo, para conferir reactividad o selectividad adicional. Como ejemplos de métodos útiles para esta finalidad cabe mencionar la conversión de aminas en ácidos carboxílicos usando reactivos tales como anhídridos dicarboxílicos; la conversión de aminas en tioles con reactivos tales como N-acetilhomocisteín-tiolactona, anhídrido S-acetilmercaptosuccínico, 2-iminotiolano o derivados de succinimidilo que contienen tiol; la conversión de tioles en ácidos carboxílicos usando reactivos tales como  $\alpha$ -haloacetatos; la conversión de tioles en aminas usando reactivos tales como etilenimina o 2-bromoetilamina; la conversión de ácidos carboxílicos en aminas usando reactivos tales como carbodiimidias y luego diaminas; y la conversión de alcoholes en tioles con reactivos como el cloruro de tosilo, seguida de transesterificación con tioacetato e hidrólisis a tiol con acetato sódico.

Los denominados enlazadores de longitud cero, que implican la unión covalente directa de un grupo químico reactivo de (A) con un grupo químico reactivo de (B), sin introducir material adicional de enlace, pueden usarse, si se desea, de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos incluyen compuestos en los que (L) representa un enlace químico que une un átomo de oxígeno de (A) a un resto carbonilo o tiocarbonilo existente en (B), de manera que el grupo de enlace resultante es un éster o un tioéster. Por ejemplo, un grupo amino (A) se puede unir a un grupo carboxilo (B) mediante el uso de la química de la carbodiimida formando A-L-B, donde L es un enlace amido o RC(=O) unido a NR, donde R es la cadena carbonada procedente de las cadenas laterales de aminoácido de la misma o de dos moléculas de proteína distintas. No obstante, más frecuentemente, el conector incluye dos o más segmentos reactivos, como los descritos arriba, unidos mediante un elemento espaciador. La presencia de un espaciador permite que los conectores bifuncionales reaccionen con grupos funcionales específicos de (A) y (B) formando un enlace covalente entre estos dos compuestos. Los segmentos reactivos de un conector (L) pueden ser iguales (conectores homobifuncionales) o distintos (conectores heterobifuncionales o, cuando hay varios segmentos reactivos distintos, conectores heteromultifuncionales), lo cual proporciona una diversidad de potenciales reactivos capaces de producir una unión covalente entre (A y B).

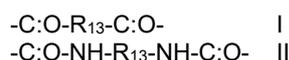
Los elementos espaciadores está formado normalmente por cadenas que separan efectivamente (A) y (B) mediante un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 10 átomos de carbono, un grupo heteroalquilo lineal o ramificado de 1 hasta 10 átomos, un grupo alqueno lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un grupo alquino lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 hasta 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 hasta 10 átomos o  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , donde n es 1 hasta 4.

La naturaleza del material extrínseco introducido por el agente conector puede influir en la farmacocinética y/o en la actividad de la vacuna final. Por consiguiente puede ser conveniente introducir conectores escindibles que contengan secciones espaciadoras biodegradables o químicamente sensibles o que incluyan sitios de escisión enzimática.

Estos conectores escindibles, como los descritos por ejemplo en la patente PCT publicada como WO 92/17436, se biodegradan fácilmente *in vivo*. En algunos casos los grupos de enlace se escinden en presencia de esterazas, pero son estables en ausencia de tales enzimas. Por lo tanto (A) y (B) se pueden unir ventajosamente de una forma que permita su liberación lenta mediante enzimas activos cerca del lugar de la enfermedad.

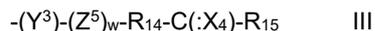
Los conectores pueden formar grupos de enlace con los grupos diéster, diamida o dicarbamato biodegradables de la fórmula:  $-(\text{Z}^1)_o-(\text{Y}^1)_u(\text{Z}^2)_s-(\text{R}_{11})_t-(\text{Z}^3)_r-(\text{Y}^2)_v-(\text{Z}^4)_p-$ , donde cada  $\text{Z}^1$ ,  $\text{Z}^2$ ,  $\text{Z}^3$  y  $\text{Z}^4$  se selecciona independientemente entre O, S y  $\text{NR}_{12}$  (donde  $\text{R}_{12}$  es hidrógeno o un grupo alquilo); cada  $\text{Y}^1$  e  $\text{Y}^2$  se selecciona independientemente entre un grupo carbonilo, tiocarbonilo, sulfonilo, fosforilo o un grupo similar formador de ácido; o, p, s, t, u, y v son independientemente 0 o 1; y  $\text{R}_{11}$  es un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 10 átomos de carbono, un grupo heteroalquilo lineal o ramificado de 1 hasta 10 átomos, un grupo alqueno lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un grupo alquino lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , donde q es 1 hasta 4, o bien un conector de enlace químico  $-(\text{Z}^1)_o-(\text{Y}^1)_u(\text{Z}^2)_s-(\text{R}_{11})_t-(\text{Z}^3)_r-(\text{Y}^2)_v-(\text{Z}^4)_p-$ .

Los ejemplos apropiados de conectores (L) pueden responder a cualquiera de las fórmulas I-II:



de modo que el conector esté unido covalentemente a un átomo de oxígeno de (A) y a un átomo de oxígeno de (B). Por lo tanto el conector (L) de las fórmulas I-II se une a las proteínas transportadoras (A) y (B) mediante los grupos de enlace dipirano, éster o carbamato. En estas formas de ejecución R<sub>13</sub> representa un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 10 átomos de carbono, un grupo alqueno lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un grupo alquino lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 hasta 10 átomos, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, donde n es 1 hasta 4, o un enlace químico que une dos nitrógenos o dos grupos carbonilo.

10 Los conectores diseñados para formar enlaces de hidrazona tienen la fórmula química III:



15 donde Z<sup>5</sup> se selecciona entre O, S o NR<sub>16</sub>; R<sub>16</sub> es hidrógeno o un grupo alquilo; R<sub>15</sub> se selecciona entre hidrógeno, un grupo alquilo o un grupo heteroalquilo; Y<sup>3</sup> se selecciona entre un grupo carbonilo, tiocarbonilo, sulfonilo, fosforilo, o un grupo similar formador de ácido unido covalentemente a un átomo de oxígeno de (A); w es 0 o 1; R<sub>14</sub> es un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 hasta 10 átomos de carbono, un grupo heteroalquilo lineal o ramificado de 1 hasta 10 átomos, un grupo alqueno lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un grupo alquino lineal o ramificado de 2 hasta 10 átomos de carbono, un resto aromático de 5 a 10 átomos de carbono, un sistema cíclico de 3 hasta 10 átomos, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, donde n es 1 hasta 4, o un enlace químico con -(Y<sup>3</sup>)-(Z<sup>5</sup>)<sub>w</sub>- y X<sub>4</sub> es el átomo de oxígeno de un grupo cetona o aldehído.

#### Proteínas transportadoras

25 En general cualquier proteína transportadora capaz de atrapar un antígeno en condiciones fisiológicas se puede usar en la presente invención. El antígeno es atrapado adecuadamente por un complejo con la matriz reticulada de proteína transportadora y/o policitación en ausencia de un enlace covalente significativo entre el antígeno y la matriz de proteína transportadora/policitación. Ausencia de enlace covalente significativo se refiere a que no más del 50% del antígeno está unido covalentemente a una proteína transportadora y/o a una policitación. En formas de ejecución adecuadas no más del 40%, 30%, 10% o 5% del antígeno está unido mediante enlace covalente a una proteína transportadora y/o a una policitación. El complejo antígeno/proteína transportadora/policitación puede incluir otro compuesto, como el alumbre.

35 Las proteínas transportadoras empleadas en las vacunas de la presente invención son adecuadamente proteínas que, solas o combinadas con un antígeno, inducen una respuesta inmune en un sujeto. La proteína transportadora contiene adecuadamente múltiples epítomos restringidos a CMH de clase II reconocidos por una célula T efectora. Es de esperar que los epítomos puedan inducir una respuesta de células T<sub>h</sub> en un sujeto y provocar que las células B produzcan los anticuerpos contra el antígeno útil y los microbios de los que procede el antígeno. Los epítomos utilizados al describir la presente invención incluyen cualquier determinante de un antígeno que es responsable de su interacción específica con una molécula de anticuerpo o un fragmento de la misma. Los determinantes epitópicos están formados en general por agrupaciones superficiales de moléculas químicamente activas tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcares y tienen unas características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga. Para poseer propiedades inmunógenas una proteína o un polipéptido debe ser en general capaz de estimular células T<sub>h</sub>. No obstante, una proteína transportadora que carezca de un epítomo reconocido por una célula T<sub>h</sub> también puede ser inmunógena.

45 Escogiendo una proteína transportadora conocida por inducir una fuerte respuesta inmune (es decir, muy inmunógena) que contenga epítomos "universales" o de "amplio rango" o "pan DR" para células T efectoras (véase p.ej. la patente WO 2008/057529) se puede tratar una población diversa de sujetos con una composición vacunal de matriz proteica aquí descrita. Es conveniente que la proteína transportadora sea lo suficientemente extraña para provocar una fuerte respuesta inmune a la vacuna. Normalmente la proteína transportadora empleada es una molécula capaz de estimular la inmunogenicidad contra el antígeno útil. En una forma de ejecución conveniente, una proteína transportadora es inherentemente muy inmunógena. Por consiguiente es deseable una proteína transportadora que tenga un alto grado de inmunogenicidad y que sea capaz de maximizar la producción de anticuerpos contra el antígeno o los antígenos complejados con ellos.

55 Varias proteínas transportadoras que son útiles para poner en práctica la presente invención incluirán, p.ej. toxinas y toxoides (químicos o genéticos), que pueden ser o no mutantes, como la toxina del ántrax, PA y DNI (PharmAthene, Inc.), toxoide diftérico (Massachusetts State Biological Labs; Serum Institute of India, Ltd.) o CRM197, toxina tetánica, toxoide tetánico (Massachusetts State Biological Labs; Serum Institute of India, Ltd.), fragmento Z de la toxina tetánica, exotoxina A o mutantes de exotoxina A de *Pseudomonas Aeruginosa*, flagelina bacteriana, neumolisina, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (cepa suministrada por la ATCC (American Type Culture Collection, [Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Va.]), proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, toxina tipo shiga, proteína LTB humana, un extracto proteico de células bacterianas enteras y cualquier otra proteína reticulable mediante un conector. Es deseable que la proteína transportadora sea la subunidad B de la toxina del cólera (suministrada por SBL Vaccin AB), toxoide diftérico o CRM197 (Connaught, Inc.), toxoide tetánico o fragmento C (suministrado por Sigma Aldrich), DNI o beta-galactosidasa de *E. coli* (suministrada

por Sigma Aldrich). Otras proteínas transportadoras adecuadas son albúmina de suero bovino (BSA), P40 y riboflavina de pollo. (A no ser que se indique otra cosa, las proteínas transportadoras mencionadas como ejemplos están son suministradas comercialmente por Sigma Aldrich). Otros ejemplos de proteínas transportadoras son las proteínas MAP (péptidos multi-antigénicos), que son péptidos ramificados. Al usar una MAP se maximiza la densidad de reticulación debido a los múltiples restos de aminoácidos ramificados. Un resto de aminoácido conveniente para la reticulación, que se puede usar para formar una MAP, es, sin limitarse a ella, de lisina, que tiene un grupo amino libre en su cadena lateral.

Tanto la BSA como la hemocianina de lapa (KLH) se han empleado frecuentemente como vehículos para desarrollar vacunas en la experimentación con animales. Las proteínas transportadoras que se han utilizado en la preparación de vacunas terapéuticas incluyen, sin limitarse a ellas, varias toxinas de bacterias patógenas y sus toxoides. Los ejemplos incluyen toxinas diftéricas y tetánicas y sus correspondientes toxoides médicamente aceptables. Otros candidatos son proteínas antigénicamente análogas a las toxinas bacterianas, llamadas materiales reticulantes (CRM). Las proteínas transportadoras útiles en la práctica de la presente invención también pueden incluir cualquier proteína no procedente de seres humanos y no existente en ninguna sustancia alimentaria humana.

En formas de ejecución adecuadas de la presente invención, para producir las PCMV se usan las proteínas que forman estructuras cíclicas. Estas proteínas incluyen la proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, las "subunidades B" no tóxicas de la toxina del cólera, la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* y la toxina tipo shiga. Estos complejos de proteínas en forma de anillo pueden formar estructuras donde las cadenas lineales de PS penetran en el canal central de estos complejos proteicos cíclicos. Tras la reticulación proteica se espera que tales complejos sean particularmente estables. Los datos estructurales de las proteínas sugieren que dichos canales centrales son suficientemente grandes para que las cadenas de PS entren fácilmente. Por ejemplo, el canal central del anillo hexamérico de la Hcp1 es de 42 Angstroms, una anchura suficiente para que entren fácilmente varias cadenas polisacáridas de 5,5 Angstroms de ancho (Mougous y otros, *Science*, 312(5779):1526-1530 (2006)). Alternativamente, los anillos proteicos se pueden reunir alrededor del polisacárido (p.ej. a partir de subunidades de una proteína transportadora monomérica, que en condiciones físico-químicas particulares se juntan naturalmente formando anillos). Estas proteínas monoméricas que pueden juntarse formando anillos son conocidas del estado técnico e incluyen por ejemplo la neumolisina (Walker y otros, *Infect. Immun.*, 55(5):1184-1189 (1987); Kancierski y Mollby, *J. Clin. Microbiol.*, 25(2):222-225 (1987)), la listeriolisina O (Kayal y Charbit, *FEMS Microbiol. Rev.*, 30:514-529 (2006); Mengaud y otros, *Infect. Immun.*, 55(12):3225-3227 (1987), el DNI, la PA de ántrax, la Hcp1, la subunidad B de la toxina del cólera, la subunidad B de la toxina de shiga, la flagelina y muchas moléculas afines conocidas del estado técnico, generadas por varios microorganismos.

En otra forma de ejecución adecuada se usan como proteínas transportadoras agonistas de receptores tipo Toll (TLR). La activación del receptor tipo Toll (TLR) es importante para moldear la respuesta inmunitaria adaptativa y puede jugar un papel en la maduración de la afinidad de la respuesta de anticuerpos, en el cambio de isotipo y en la memoria inmunológica. La flagelina (FLA) de *Vibrio cholerae* es un agonista de TLR. La proteína FLA ha sido purificada a partir de *Escherichia coli* recombinante y se ha demostrado que es un potente activador de TLR en un ensayo de inducción de IL-6 por macrófagos. También se ha demostrado que una proteína bien conservada de *Streptococcus pneumoniae* llamada "neumolisina" el activa TLR4 y además es un antígeno protector. Por lo tanto esta proteína también se puede utilizar como proteína transportadora en la matriz proteica.

Asimismo, las mezclas de proteínas de membrana externa (OMP) (p.ej. las OMP de *Neisseria meningitidis*) se utilizan como proteína transportadora de la vacuna conjugada HIB producida por Merck y los extractos proteicos de las células bacterianas de *Streptococcus pneumoniae* enteras han resultado ser, al menos parcialmente, protectoras en modelos de infección animal. En formas de ejecución adecuadas de la presente invención, estas mezclas proteicas se pueden usar como proteínas transportadoras.

En una forma de ejecución idónea, la composición vacunal se prepara utilizando una proteína transportadora que tiene p.ej. al menos dos restos de lisina u otros restos que están desbloqueados y pueden ser reticulados por modificación química. En otras formas de ejecución adecuadas la proteína transportadora es un multímero (p.ej. una proteína que contiene al menos 5 subunidades).

En otra forma de ejecución se usa DNI como proteína transportadora porque no es tóxica y por tanto no es necesario disminuir su toxicidad de usarla. El uso de DNI también es deseable porque es capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra *B. anthracis*, además de la respuesta inmune protectora provocada por el antígeno útil. Además, el DNI no tiene enlaces internos de disulfuro. Dichos enlaces son susceptibles a la reducción por borohidruro, que podría desnaturalizar la proteína y causar la pérdida de los epítomos que inducen el anticuerpo neutralizador de la toxina del ántrax.

#### Antígenos útiles

Las composiciones vacunales de la presente revelación y los métodos para preparar y administrar dichas vacunas se pueden usar para cualquier antígeno útil y son especialmente ventajosas para usar con antígenos que no sean por sí mismos fuertemente inmunógenos, incluyendo p.ej. un gran número de antígenos polisacáridos, polialcohólicos o poli aminoácidos. Es conveniente que el antígeno útil no lleve grupos primarios que puedan resultar destruidos por las

reacciones químicas empleadas por el método de preparación de las vacunas, como p.ej. la desnaturalización de un antígeno causada por la destrucción de los enlaces disulfuro del antígeno por reducción con borohidruro. Los ejemplos de antígenos útiles incluyen, sin limitarse a ellos, polímeros orgánicos tales como polisacáridos (p.ej. polisacáridos formados por al menos 18 restos), fosfopolisacáridos, polisacáridos con amino azúcares y sustituciones con N-acetilo, polisacáridos que contengan azúcares sulfonados, otros azúcares modificados con sulfato o azúcares modificados con fosfato, polialcoholes, poliaminoácidos, ácidos teicoicos, cadenas laterales O de lipopolisacáridos. También son ejemplos de antígenos útiles los polímeros orgánicos capsulares, incluyendo los sintetizados por microbios como p.ej. bacterias, hongos, parásitos y virus, y luego purificados a partir de dicha fuente biológica utilizando métodos estándar. Entre los ejemplos de antígenos útiles cabe mencionar los polímeros orgánicos capsulares microbianos, incluyendo los purificados a partir de organismos bacterianos como las especies de *Bacillus* (incluyendo *B. anthracis*) (Wang y Lucas, Infect. Immun., 72(9):5460-5463 (2004)), *Streptococcus pneumoniae* (Bentley y otros, PLoS Genet., 2(3):e31 (2006); Kolkman y otros, J. Biochemistry, 123:937-945 (1998); y Kong y otros, J. Med. Microbiol., 54:351-356 (2005)), *Shigella* (Zhao y otros, Carbohydr. Res., 342 (9): 1275-1279 (2007)), *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* (Zhao y otros, Carbohydr. Res., 342(9):1275-1279 (2007)) y *Pseudomonas aeruginosa* y organismos fúngicos como *Cryptococcus* y *Candida*, así como muchos otros microorganismos (véase p.ej. Ovodov, Biochemistry (Mosc.), 71(9):937-954 (2006); Lee y otros, Adv. Exp. Med. Biol., 491:453-471 (2001) y Lee, Mol. Immunol., 24(10):1005-1019 (1987)). Los ejemplos de antígenos útiles también incluyen polímeros inexistentes en la naturaleza, que por tanto no son de origen biológico.

Los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* en particular incluyen el polisacárido capsular de tipo 1 (p.ej., 1-g o 1-q), 2 (p.ej., 2-g, 2-q, o 2-41A), 3 (p.ej., 3-g, 3-q, 3-c, o 3-nz), 4, 5 (p.ej., 5-q, 5-c, 5-qap, o 5-g), 6A (p.ej., 6A-g, 6A-cl, 6A-c2, 6A-n, 6A-qap, 6A-6B-g, 6A-6B-q, o 6A-6B-s), 6B (p.ej., 6B-c, 6A-6B-g, 6A-6B-q, o 6A-6B-s), 7F (p.ej., 7F-7A), 7A (p.ej., 7Acn o 7F-7A), 7B (p.ej., 7B-40), 7C (p.ej., 7C-19C-24B), 8 (p.ej., 8-g o 8-s), 9A (p.ej., 9A-9V), 9L, 9N, 9V (p.ej., 9A-9V), 9V and 14, 10F (p.ej., 10F-q, 10F-ca, o 10F-10C), 10A (p.ej., 10A-17A o 10A-23F), 10B (p.ej., 10B-10C), 11F, 11A (p.ej., 11A-nz o 11A-11D-18F), 11B (p.ej., 11B-11C), 11C (p.ej., 11B-11C. o 11C-cn), 11D (p.ej., 11A-11D-18F), 12F (p.ej., 12F-q o 12F-12A-12B), 12A (p.ej., 12A-cn, 12A-46, o 12F-12A-12B), 12B (p.ej., 12F-12A-12B), 13 (p.ej., 13-20), 14 (p.ej., 14-g, 14-q, 14-v, o 14-c), 15F (p.ej., 15F-cn1 o 15F-cn2), 15A (p.ej., 15A-ca1, 15A-ca2, o 15A-chw), 15B (p.ej., 15B-c, 15B-15C, 15B-15C-22F-22A), 15C (p.ej., 15C-ca, 15C-q1, 15C-q2, 15C-q3, 15C-s, 15B-15C, o 15B-15C-22F22A), 16F (p.ej., 16F-q o 16F-nz), 16A, 17F (p.ej., 17F-n and 17F-35B-35C-42), 17A (p.ej., 17A-ca o 10A-17A), 18F (p.ej., 18F-ca, 18F-w, o 11A-11D-18F), 18A (p.ej., 18A-nz o 18A-q), 18B (p.ej., 18B-18C), 18C (p.ej., 18B-18C), 19F (p.ej., 19F-g1, 19F-g2, 19F-g3, 19F-q, 19F-n, o 19F-c), 19A (p.ej., 19A-g, 19A-, o 19A-ca), 19B, 19C (p.ej., 19C-cn1, 19C-cn2, o 7C-19C-24B), (p.ej., 13-20), 21 (p.ej., 21-ca o 21-cn), 22F (p.ej., 15B-15C-22F-22A), 23F (p.ej., 23F-c, 10A23F, o 23F-23A), 23B (p.ej., 23B-c o 23B-q), 24F (p.ej., 24F-cn1, 24F-cn2, o 24F-cn3), 24A, 24B (p.ej., 7C-19C-24B), 25F (p.ej., 25F-38), 25A, 27, 28F (p.ej., 28F-28A o 28F-cn), 28A (p.ej., 28F-28A), 29 (p.ej., 29-ca o 29-q), 31, 32F (p.ej., 32F-32A), 32A (p.ej., 32A-cn o 32F-32A), 33F (p.ej., 33F-g, 33F-q, 33F-chw, 33F-33B, o 33F-33A-35A), 33A (p.ej., 33F33A-35A), 33B (p.ej., 33B-q, 33B-s, o 33F-33B), 33D, 34 (p.ej., 34-ca o 34s), 35F (p.ej., 35F-47F), 35A (p.ej., 33F-33A35A), 35B (p.ej., 17F-35B-35C-42), 36, 37 (p.ej., 37-g o 37-ca), 38 (p.ej., 25F-38), 39 (p.ej., 39-cn1 o 39-cn2), 40 (p.ej., 7B-40), 41F (p.ej., 41F-cn o 41F-s), 41A (p.ej., 2-41A), 42 (p.ej., 17B-35B-35C-42), 43, 44, 45, 46 (p.ej., 46-s o 12A-46), 47F (p.ej., 35F-47F), 47A, 48 (p.ej., 48-cn1 o 48-cn2), o el número de acceso al banco de genes AF532714 o AF532715.

Cabe mencionar especialmente los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* seleccionados del grupo formado por los tipos capsulares 3, 4, 6B, 7A, 7B, 7C, 7F, 9A, 9L, 9N, 9V, 12A, 12B, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 17, 18B, 18C, 19F, 23F, 25A, 25F, 33F, 35, 37, 38, 44, o 46.

#### Policonaciones

En la presente invención se puede usar adecuadamente cualquier policonación que posea una carga positiva repetitiva en forma de un grupo amino libre, primario, secundario o terciario. Los ejemplos de policonaciones incluyen, sin limitarse a ellos, poli-L-lisina, quitosano [copolímero con enlaces  $\beta$ - (1-4) de 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucano (GlcN) y 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucano (GlcNAc)], poliarginina y polímeros sintéticos disponibles comercialmente que contienen grupos amino libre como polietilenimina ramificada (PEI), poliamina N7 (CAS 29320-38-5) y etilendiaminometil poliestireno (CAS 177987-93-8).

En formas de ejecución adecuadas la poli-L-lisina es  $\alpha$ -poli-L-lisina (alfa-poli-L-lisina) o  $\epsilon$ -poli-L-lisina (épsilon-poli-L-lisina). Los restos de lisina de la poli-L-lisina están unidos mediante un enlace peptídico entre el grupo carboxilo y el grupo amino alfa ( $\alpha$ -PLL) o épsilon ( $\epsilon$ -PLL). Es deseable que la poli-L-lisina sea  $\alpha$ -poli-L-lisina. La  $\alpha$ -poli-L-lisina se sintetiza químicamente y se puede obtener con varios pesos moleculares, por ejemplo, de 0,5 hasta 300 kDa. La  $\epsilon$ -poli-L-lisina es un homopolímero corto natural del aminoácido esencial L-lisina producido por fermentación bacteriana, por ejemplo, la  $\epsilon$ -poli-L-lisina se puede aislar de *Streptomyces albulus* y tiene una masa molecular media aproximada de 4000 Da.

Se cree que los policonaciones realizan dos funciones en el proceso de formación de una vacuna matricial: 1) actuando como un contraíón de los polímeros antigénicos cargados negativamente y 2) en el caso de policonaciones que contienen aminas primarias y agentes reticulantes que reaccionan con los grupos amino, ayudando a formar la matriz mediante la creación de enlaces cruzados con otras moléculas policoniónicas o con moléculas de proteínas transportadoras.

Estas dos propiedades de los policonjugados permitirán un mejor atrapamiento de los antígenos en la matriz proteica, mejorando así el rendimiento de la formación de partículas de PCMV. Esto se puede observar en la figura 1, donde la cantidad de polisacáridos atrapados en la matriz mejoró desde el 5% hasta más del 50% con la adición de  $\alpha$ PLL.

5 Como la formación de vacunas conjugadas también puede verse afectada negativamente por la repulsión de cargas entre el antígeno y la proteína transportadora, el empleo de un policonjugado también podría mejorar la eficiencia de la conjugación. Dado que muchas químicas de conjugación consisten en unir el polímero a la proteína transportadora mediante grupos amino primarios de la proteína transportadora (p.ej. restos de lisina), el uso de un policonjugado que no lleve aminas primarias, como la poliarginina, puede ser beneficioso para evitar la conjugación del antígeno polimérico al policonjugado. Sin embargo, los policonjugados que contienen aminas primarias también podrían utilizarse para ayudar a hacer una vacuna matricial en que los polisacáridos se unieran de forma covalente (reticulada) a la matriz. La cantidad, el tamaño y el tipo del policonjugado necesario para mejorar el atrapamiento de los antígenos y la formación de la matriz podrían depender de la composición, del grado de carga negativa, del tamaño, de la funcionalidad de la amina (u otro grupo reactivo) y de la estructura secundaria o terciaria del antígeno polimérico. Además, si se agrega más de un antígeno polimérico a la reacción de la vacuna matricial (vacuna multivalente), las interacciones entre los polímeros podrían influir en la selección del policonjugado para mejorar el atrapamiento. Esto se puede observar en los ensayos de PCMV de PPS trivalente, 13-valente y 23-valente presentados en los siguientes ejemplos 5, 6, 8 y 9. Cuando se usó el  $\epsilon$ -PLL, que tiene un peso molecular medio de 4000 Da, en las reacciones de PCMV trivalentes, el atrapamiento de los polisacáridos PPS4, PPS18C y PPS23F fue moderado y, a pesar de mejorar la inmunogenicidad de los antígenos polisacáridos en comparación con el polisacárido solo, no alcanzó el nivel observado con la vacuna conjugada. Sin embargo, cuando se usó el  $\epsilon$ -PLL para preparar la PCMV de PPS 13-valente, la inmunogenicidad del PPS4 y PPS18C mejoró 3,4 veces y 107 veces, respectivamente, en comparación con la PCMV de PPS trivalente, lo cual sugiere que el atrapamiento de estos dos polisacáridos mejoró con el  $\epsilon$ -PLL debido a las interacciones con los otros polisacáridos en la reacción de PPS 13-valente. El uso del  $\alpha$ -PLL (150-300 kDa) en las reacciones trivalentes mejoró aún más la inmunogenicidad del PPS4, provocando un GMT 132 veces mayor que el provocado por la PCMV de PPS 13-valente. Sin embargo, con el uso del  $\alpha$ -PLL (150-300 kDa) en la preparación de la PCMV de PPS 23-valente pareció obtenerse un menor atrapamiento del PPS4, ya que el GMT para el PPS4 en esta PCMV fue 2650 veces menor que con la PCMV de PPS/ $\alpha$ -PLL trivalente; ello sugiere que en la reacción 23-valente los otros polisacáridos pueden tener una influencia negativa en el atrapamiento del PPS4 con  $\alpha$ -PLL (150-300 kDa). La determinación de la cantidad óptima, del tamaño (peso molecular) y de la composición del componente policonjugado utilizado para atrapar cada polisacárido o grupo de polisacáridos u otros antígenos puede determinarse empíricamente examinando la capacidad del policonjugado para hacer que el antígeno o antígenos polisacáridos se desplacen hacia un peso molecular más elevado, conforme a lo determinado por cromatografía de exclusión de tamaños. Este desplazamiento, que indica la incorporación de los antígenos a partículas de mayor tamaño a medida que el antígeno es atrapado y asociado con una matriz proteica, se puede observar en varias de las figuras presentadas aquí y comentadas más adelante.

#### Composiciones vacunales

40 Las composiciones vacunales de la presente revelación, incluyendo las PCMV, se pueden emplear combinadas, por ejemplo en vacunas pediátricas. Además, las composiciones vacunales se pueden usar para vacunar, por ejemplo, contra la infección neumocócica, la infección por *Haemophilus influenzae* tipo B ("HiB"), la infección por *Streptococcus* (de los grupos A y B), la infección meningocócica (p.ej. por *Neisseria meningitidis*), y se pueden usar como vacunas capsulares y de antígenos O contra bacterias Gram negativas (p.ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, especies de *Shigella*, serovares de *Salmonella* entérica, especies de *Acinetobacter*, especies de *Burkholderia* y *Escherichia coli*).

50 Es conveniente que la formulación vacunal incluya al menos una proteína transportadora, uno o más antígenos útiles, al menos un policonjugado y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (p.ej. fosfato aluminico, cloruro sódico, agua estéril). Una composición vacunal también puede incluir un sistema adyuvante para mejorar la inmunogenicidad de la formulación, por ejemplo un sistema aceite en agua, alumbre u otros sistemas conocidos del estado técnico u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Es deseable un complejo antígeno/matriz de proteína transportadora/policonjugado que sea insoluble en condiciones fisiológicas, para liberar lentamente el antígeno tras la administración a un sujeto. Dicho complejo se suministra adecuadamente en una suspensión que contiene excipientes farmacéuticamente aceptables. No obstante, el complejo antígeno/matriz de proteína transportadora/policonjugado también puede ser soluble en condiciones fisiológicas.

60 La composición vacunal de matriz proteica tiene normalmente un volumen aproximado de 0,5 ml para una inyección subcutánea, 0,5 ml para una inyección intramuscular, 0,1 ml para una inyección intradérmica o 0,002-0,02 ml para una administración percutánea. Una dosis de 0,5 ml de composición vacunal de matriz proteica puede contener 2-500  $\mu$ g aproximadamente de antígeno atrapado en unos 2-500  $\mu$ g de matriz de proteína transportadora/policonjugado. De manera preferible, en una dosis de 0,5 ml se atrapan aproximadamente 10  $\mu$ g de antígeno con aproximadamente 10  $\mu$ g de la matriz de proteína transportadora/policonjugado. La relación molar de antígeno a proteína transportadora/policonjugado está comprendida convenientemente entre 1 a 10 (p.ej. 1 parte de antígeno a 2 partes de vehículo/policonjugado o 1 parte de antígeno a 3 partes de vehículo/policonjugado, etc., hasta 1 parte de antígeno a 10 partes de vehículo/policonjugado) y 10 a 1 (p.ej. 10 partes de antígeno por 1 parte de vehículo/policonjugado o 9 partes de antígeno por 1 parte de vehículo/policonjugado, etc.). Preferiblemente, la relación molar de antígeno a vehículo/policonjugado es de 1 a 1. Como alternativa, la relación en

peso seco de antígeno a proteína transportadora/policación está comprendida adecuadamente entre 1 a 10 y 10 a 1 (p.ej. 1 a 1 en peso seco).

5 Como el complejo antígeno/matriz de proteína transportadora/policación se puede degradar en el estómago, la composición vacunal se administra oportunamente por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o intradérmica). Aunque es deseable un tipo de administración basado en la penetración física de la capa dérmica (p.ej. con una aguja, con una pistola de aire comprimido o por abrasión), las composiciones vacunales de la presente invención también se pueden administrar por absorción transdérmica.

10 En concreto las composiciones vacunales se pueden administrar a un sujeto, p.ej. mediante inyección intramuscular, inyección intradérmica o por inmunización transcutánea, con adyuvantes inmunitarios apropiados. Las composiciones vacunales de la presente revelación pueden administrarse una o más veces, incluyendo con frecuencia una segunda administración diseñada para estimular la producción de anticuerpos en un sujeto, para prevenir la infección por un agente infeccioso correspondiente al antígeno o antígenos incluidos en la vacuna. La frecuencia y cantidad de la dosis de la vacuna para obtener la respuesta inmune o el nivel de inmunidad deseados depende de la actividad específica de la vacuna y se puede determinar fácilmente mediante experimentación rutinaria. Por ejemplo, para un bebé, un programa de vacunación puede ser de tres dosis respectivas de 0,5 ml a intervalos de aproximadamente cuatro a ocho semanas (empezando a los dos meses de edad), seguidas de una cuarta dosis de 0,5 ml a aproximadamente doce a quince meses de edad. Para algunas vacunas puede ser conveniente una quinta dosis entre los cuatro y seis años de edad

20 Aunque la edad a la que se administra la primera dosis es en general de dos meses, se puede administrar una vacuna a bebés de solo 6 semanas de edad. Para los adultos, dos o más dosis de 0,5 ml administradas a intervalos de 2 a 8 semanas son suficientes generalmente para proporcionar una protección duradera. Es recomendable que se dé una dosis de refuerzo cada diez años a los adultos previamente inmunizados y a los niños mayores de once años.

25 Las composiciones vacunales pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, en ampollas y viales sellados, y pueden conservarse liofilizadas, de manera que solo haga falta la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes del uso. Las vacunas de la presente revelación se pueden formular en vehículos farmacológicamente aceptables, p.ej. en gel de hidróxido de alumbre, preparación adyuvante o suero fisiológico, y después se pueden administrar, p.ej. mediante inyección intramuscular, inyección intradérmica o por inmunización transcutánea con adyuvantes inmunitarios apropiados.

30 Aquí también se describen kits que llevan una vacuna descrita en este documento (p.ej. una PCMV). Los kits también pueden incluir instrucciones de uso de los mismos en los métodos de vacunación aquí descritos.

35 La eficacia del programa de inmunización se puede determinar empleando métodos estándar para medir el título de anticuerpos en el sujeto inmunizado. En general, los títulos medios de anticuerpos (adecuadamente títulos de IgG) de aproximadamente 1 µg/ml se consideran indicativos de una protección duradera.

40 Aquí también se revelan composiciones vacunales que contienen un antígeno útil atrapado en una matriz de proteína transportadora/policación, métodos para preparar dichas composiciones vacunales y métodos de administración de las vacunas. Se ha encontrado que la eficiencia de la formación de PCMV, y por lo tanto su rentabilidad como vacunas, mejora añadiendo un policación, como p.ej. poli-L-lisina, a la matriz proteica. Además, los policaciones también pueden ser beneficiosos para mejorar la eficiencia de las reacciones de conjugación destinadas a la producción de las vacunas conjugadas usuales, en las cuales el antígeno polimérico está unido por enlace covalente a la proteína transportadora, haciendo más rentable la vacuna conjugada. Brevemente, tal como se ilustra aquí, las composiciones vacunales de matriz proteica que llevan un policación tienen una mayor inmunogenicidad, en comparación con las composiciones que contienen el antígeno solo o el antígeno atrapado en una matriz de proteína transportadora que no lleva policación.

45 Se cree que la mayor inmunogenicidad de las composiciones vacunales de matriz proteica que contienen un policación se debe a un mejor atrapamiento del antígeno polisacárido en la matriz de proteína/policación, lo cual permite un mayor contenido de antígeno en una dosis de vacuna, en comparación con la misma dosis de una vacuna sin policación. Como ya se ha dicho aquí, las cápsulas polisacáridas de las bacterias están compuestas de azúcares repetitivos y en muchas bacterias patógenas estas cápsulas tienen una carga negativa neta. La carga negativa de la cápsula puede repeler la proteína de la matriz, perjudicando el atrapamiento del antígeno polisacárido. Para contrarrestar esta carga negativa se puede añadir un policación, por ejemplo poli-L-lisina (PLL), a las reacciones de PCMV. Además, las aminas primarias que llevan policaciones como PLL, también pueden ayudar a la formación de la matriz por reticulación entre otras moléculas de PLL o de proteínas transportadoras.

50 Aunque los ejemplos siguientes describen el uso de policaciones en la formación de vacunas de matriz proteica, estos policaciones también se pueden usar beneficiosamente de manera similar en la producción de las vacunas conjugadas convencionales.

#### Ejemplo 1: PCMV de Vi-CRM197-αPLL

65

El efecto de la adición de policlones en las composiciones vacunales matriciales se investigó usando como antígeno la cápsula polisacárida Vi de *Salmonella enterica* Serovar Typhi, una toxina diftérica no tóxica CRM197 como proteína transportadora (preparada en Matrivax Research and Development Corporation, Boston, MA, EAU) y  $\alpha$ -poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como policlón.

El Vi es un homopolímero muy aniónico compuesto por ( $\alpha$ 1-4)-D-GalANAc variablemente O-acetilado en C-3. Una de las actuales vacunas aprobadas para la fiebre tifoidea es TyphimVi® (Sanofi Pasteur SA), que contiene el polisacárido Vi no conjugado como antígeno. En estudios iniciales para comprobar si las vacunas de matriz de proteína se podrían usar con éxito para administrar el antígeno Vi y provocar una respuesta inmune, se prepararon PCMV en reacciones que contenían 4 mg/ml de Vi como antígeno y 4 mg/ml de CRM197 como proteína transportadora formadora de la matriz. La formación de la matriz se inició añadiendo glutaraldehído como agente reticulante. Después de incubar durante 24 horas a 4°C con un movimiento continuo de vaivén, el producto de reacción se separó en una columna de 2,6 x 10 cm de Sefarosa CL2B y las fracciones de alto peso molecular se recogieron, se adyuvan con alumbre y se utilizaron para inmunizar ratones. Usando la cantidad de Vi que se desplazó hacia un peso molecular más alto después de la reacción, se estimó que < 5% del Vi estaba atrapado en la matriz proteica de la reacción de PCMV. Los títulos de anticuerpos anti-Vi para las composiciones de PCMV fueron aproximadamente 3 veces más elevados que con el polisacárido solo (control), pero fueron más bajos que los inducidos por la actual vacuna comercial de polisacáridos Vi TyphimVi®. En cambio se ha demostrado en la literatura que las vacunas conjugadas con Vi, p.ej. Vi-CRM197, inducen títulos 40 a 100 veces más altos que el polisacárido solo. Véase p.ej. Rondini y otros, 2011, *Clinical and Vaccine Immunology*, 18:460-468; Cui y otros, 2010, *Clinical and Vaccine Immunology*, 17:73-79; An y otros, 2011 *Vaccine* 44: 7618-7623 Micoli y otros, 2011, *Vaccine*, 29:712-720.

Se creía que la mala inmunogenicidad de las partículas de PCMV de Vi en comparación con las vacunas conjugadas era debida potencialmente a un mal atrapamiento de la Vi en la matriz de CRM197, a una separación deficiente de las partículas de PCMV del Vi no atrapado (libre), o a ambas cosas.

Debido a la gran naturaleza aniónica del Vi se planteó la hipótesis de que el Vi repelía el CRM197 durante la etapa clave de reticulación, interfiriendo en el atrapamiento eficiente dentro de las partículas de PCMV.

Inicialmente se investigó la adición de sal a la PCMV para reducir la repulsión de la carga; pero tras la reticulación se formó un precipitado insoluble.

El efecto de un policlón se investigó en el proceso de PCMV: se prepararon dos PCMV para el primer ensayo de inmunización usando poli-L-lisina (PLL); cada reacción de PCMV contenía 4 mg/ml de Vi, 4 mg/ml de CRM197 y 0,01% de  $\alpha$ -poli-L-lisina (150-300 kDa). Se incubó Vi y  $\alpha$ -poli-L-lisina ( $\alpha$ -PLL) durante 15 minutos a temperatura ambiente con un movimiento continuo de vaivén antes de añadir glutaraldehído al 0,25% como agente reticulante y CRM197 como proteína transportadora. Se añadió 0,01 mg/ml de flagelina (Flg) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a una de las mezclas de reacción como aditivo coadyuvante. Se continuó incubando durante 10 minutos más a temperatura ambiente con vaivén continuo antes de ponerla a 4°C durante 24 horas en agitación constante. La separación de las reacciones de PCMV se realizó en una columna Sephacryl S-1000 de 2,6 x 30 cm. Una vez separados los productos de reacción en la columna se determinaron los niveles de proteína y polisacárido usando los kits de ensayo microBCA (Pierce Chemical) y Stains-All (Sigma Chemical), respectivamente. Aproximadamente el 20% del Vi se desplazó hacia un peso molecular más alto y se eluyó conjuntamente con el pico de proteína, lo cual sugiere que el Vi quedó atrapado dentro de la matriz de la proteína transportadora/policlón (figura 2). Se recogieron y agruparon estas fracciones de alto peso molecular (véase figura 2, fracciones recuadradas), se les agregó adyuvante de alumbre y se usaron para la inmunización.

Se inmunizaron grupos de cinco ratones BalBC (Jackson Laboratories) con 10  $\mu$ g de Vi en forma de PCMV, Matrivax Vi solo o vacuna tifoidea TyphimVi® de polisacárido Vi (Sanofi Pasteur SA) a 3 intervalos bisemanales. Los ratones se sacrificaron 3 semanas después de su última inmunización y el nivel de anticuerpos específicos de Vi se determinó mediante ensayos ELISA. Los títulos medios geométricos de punto final (GMT) de dichas inmunizaciones se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Inmunogenicidad de vacunas PCMV de Vi-CRM197 preparadas con  $\alpha$ PLL**

Grupos (dosis por $\mu$ g de Vi)	GMT de IgG Anti-Vi
10 $\mu$ g de PCMV de Vi-CRM197- $\alpha$ PLL + alumbre	65.302
10 $\mu$ g de PCMV de Vi-CRM197- $\alpha$ PLL-Flg + alumbre	492.092
Vi	1.600
Typhim Vi®	5.572

A partir de estos resultados se puede ver que al utilizar  $\alpha$ -PLL en las reacciones, las PCMV indujeron unos títulos de anticuerpos anti-Vi que fueron 40 veces más altos que los observados con el polisacárido Vi solo (tabla 1). Además, la incorporación de pequeñas cantidades de flagelina a la PCMV que contenía  $\alpha$ -PLL indujo títulos de anticuerpos anti-Vi aún más altos, con un GMT que fue 300 veces mayor que la inmunización inducida por el polisacárido Vi solo y 7,5

veces mayor que la inducida por PCMV sin flagelina. La presencia de la flagelina no afectó a la cantidad de Vi atrapada por el PLL (datos no mostrados).

5 Es interesante cómo la poli-L-arginina (PLA), que también es un polication y tiene el mismo grado de carga positiva que la PLL, pero no contiene aminas primarias repetitivas, no mejoró el atrapamiento de Vi (datos no mostrados), lo cual indica que la PLL estaba contrarrestando la carga negativa del Vi y contribuía a formar la matriz reticulándose con otras moléculas de PLL y CRM197.

10 Ejemplo 2: separación mejorada de las PCMV de Vi-CRM197-αPLL

10 A fin de eliminar mejor las especies de bajo peso molecular (supuestamente un polímero de antígeno no conjugado y no atrapado) de las partículas de PCMV se utilizó una columna de exclusión de tamaños más larga (de 90 cm). En concreto se preparó una mezcla de reacción de reticulación de PCMV que contenía 4 mg/ml de Vi, 4 mg/ml de CRM197 y 0,01% de α-poli-L-lisina (150-300 kDa). Se incubó Vi y αPLL durante 15 minutos a temperatura ambiente, con una  
15 agitación de vaivén continuo, antes de añadir glutaraldehído al 0,25% y CRM197. Se siguió incubando durante otros 10 minutos a temperatura ambiente agitando con vaivén continuo y luego durante 24 horas a 4°C con vaivén constante. Después de separar el producto de reacción en la columna SEC se determinaron los niveles de proteína y polisacárido mediante microBCA y el ensayo de tinción total, respectivamente. Para determinar si el tamaño o el peso molecular de las partículas de PCMV influían en su inmunogenicidad se agruparon las fracciones de 3 momentos diferentes de  
20 elución de la columna SEC y se usaron para la inmunización. En la figura 3 se han marcado los grupos seleccionados. La elución de los grupos 1 y 2 de la columna no difirió significativamente; sin embargo, se sospechó que el grupo 3 tenía un peso molecular más bajo que los grupos 1 y 2 y que contenía más Vi no atrapado. .

25 Se inmunizaron grupos de cinco ratones con 10 µg de Vi de las composiciones estudiadas mediante 3 inyecciones bisemanales. Los ratones se sacrificaron una vez transcurridas 3 semanas desde su última inmunización y el nivel de anticuerpos específicos de Vi se determinó mediante ensayos ELISA. Se compararon los GMT de punto final de dichas inmunizaciones (tabla 2).

30 La combinación de PLL y la mejor separación de tamaños nos permitió crear unas PCMV de Vi-CRM197 que indujeron títulos de anticuerpos anti-Vi entre 485 y 1400 veces más altos que con el Vi solo y 22 veces más altos que con la vacuna tifoidea TyphimVi® (tabla 2; grupos 1 y 2).

**Tabla 2. Inmunogenicidad de fracciones de distinto tamaño de una PCMV de Vi-CRM197-αPLL**

Grupos (dosis por µg de Vi)	GMT de IgG Anti-Vi
10 µg de PCMV de Vi-CRM197-αPLL (grupo 1) + alumbre	11.652
10 µg de PCMV de Vi-CRM197-αPLL (grupo 2) + alumbre	33.779
10 µg de PCMV de Vi-CRM197-αPLL (grupo 3) + alumbre	1.063
10 µg de Vi solo	24
Naïf	5

35 Aunque el GMT inducido por la PCMV del grupo 3 fue 44 veces más alto que con el Vi solo y 1,3 veces más alto que con la vacuna tifoidea comercial TyphimVi®, fue más bajo que los inducidos por los grupos 1 y 2, lo cual puede ser debido al menor peso molecular de las PCMV y/o a la presencia de mayores cantidades de Vi no atrapado o "libre".

40 Ejemplo 3: PCMV de PPS18C-CRM197-αPLL

Visto el mejor atrapamiento del Vi al usar α-PLL, probamos luego si la α-PLL mejoraría el atrapamiento del polisacárido neumocócico PPS18C, menos cargado negativamente. A diferencia del Vi, en el cual cada resto de azúcar tiene una carga negativa, el PPS18C solo tiene una carga negativa por cada 5 restos de azúcar. Sin embargo la inclusión de un  
45 0,04% de α-PLL (15-30 kDa) en las reacciones de PCMV produjo un desplazamiento del 35% del polisacárido desde un peso molecular más bajo hacia una fracción de peso molecular más alto separada por SEC (figura 4). La mayoría del CRM197 presente en la reacción de PCMV también se desplazó hacia las fracciones de alto peso molecular. Se demostró que el polisacárido presente en las fracciones de peso molecular elevado es capturado por una partícula de PCMV usando un ensayo ELISA de captura en el cual las partículas de PCMV se unen a la placa de ELISA mediante  
50 anticuerpos anti-CRM197 y al polisacárido detectado con antisueros específicos del serotipo (datos no mostrado).

Ejemplo 4 – El aumento de PLL incrementa el atrapamiento del Vi en las PCMV.

55 Las reacciones de reticulación de PCMV se realizaron utilizando 0,01% y 0,02% de αPLL (150-300 kDa) y 0,04% de αPLL (15-30 kDa), 4 mg/ml de Vi y 4 mg/ml de CRM197. Las reacciones se separaron en una columna de Sepharcryl S-1000 de 500 ml (90 cm x 2,6 cm) y las fracciones se analizaron para determinar la proteína y el polisacárido mediante microBCA y el ensayo Stains-all, respectivamente (figura 5). Al aumentar la concentración de PLL (150-300 kDa) de 0,01% a 0,02%, la cantidad de Vi atrapado aumentó de 15% a 21%. El aumento del atrapamiento del Vi no tuvo ningún efecto en la inmunogenicidad de las PCMV sintetizadas con ambas concentraciones de PLL, obteniéndose títulos de

anticuerpos anti-Vi que fueron 14 hasta 20 veces más altos que con Vi solo y 2 hasta 3 veces más altos que con la vacuna tifoidea TyphimVi® (datos no mostrados). Al usar un 0,04% de un  $\alpha$ -PLL más pequeño (15-30 kDa) la cantidad de Vi atrapado aumentó hasta el 64%. El aumento del atrapamiento con el PLL de peso molecular más bajo no dio como resultado una mayor inmunogenicidad de la PCMV respecto al Vi solo (datos no mostrados). Hemos supuesto que la mayor concentración del  $\alpha$ -PLL de menor peso molecular (15-30 kDa) puede estar enmascarando los epítomos de Vi (datos no mostrados).

#### Ejemplo 5: PCMV tivalentes

Para investigar si los efectos beneficiosos de un policación en una PCMV podrían utilizarse en PCMV multivalentes se preparó una vacuna antineumocócica trivalente que llevaba los antígenos polisacáridos neumocócicos PPS18C, PPS4 y PPS23F. La PCMV se preparó del modo siguiente: la mezcla de reacción de PCMV contenía 5 mg/ml de polisacárido total (unos 1,7 mg/ml respectivamente de PPS18C, PPS4 y PPS23F), 1 mg/ml de CRM197 y 0,04% de  $\epsilon$ -poli-L-lisina (4 kDa, Binafo Bioengineering Co. Ltd., Zhengzhou, PRC). El polisacárido y la  $\epsilon$ -poli-L-lisina se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con un movimiento de vaivén continuo, antes de añadir glutaraldehído al 0,25% como agente reticulante y CRM197 como proteína matricial. Se continuó incubando durante 10 minutos más a temperatura ambiente agitando con vaivén continuo, antes de ponerla a 4°C durante 24 horas con vaivén constante. La separación de la PCMV de PPS18C/PPS4/PPS23-CRM197- $\epsilon$ PLL se efectuó en una columna Sephacryl S-1000 de 2,6 x 90 cm. Las fracciones se analizaron para determinar el polisacárido usando el ensayo de antrona, la proteína por MicroBCA y el atrapamiento de cada polisacárido en partículas de PCMV usando un ELISA de captura (véase figura 5). El ensayo de antrona es un ensayo colorimétrico que detecta hexosas después de una hidrólisis en ácido sulfúrico concentrado. Trevelyan, y otros, 1952, "Determination of Yeast Carbohydrates with the Anthrone Reagent [Determinación de los carbohidratos de levadura con el reactivo de antrona]", Nature, 170(4328):626-627. Se observó un ELISA de captura fuertemente positiva del PPS4 (datos no mostrados); sin embargo se observaron señales débiles con PPS18C y 23F. Se agruparon las fracciones que contenían polisacáridos de peso molecular elevado y que dieron positivo en el ELISA de captura (véase figura 6, fracciones recuadradas), se les agregaron adyuvantes de alumbre y se utilizaron para las inmunizaciones.

Se inmunizaron grupos de 10 ratones utilizando el mismo régimen de dosificación arriba descrito para la PCMV de Vi. Cada dosis de PCMV trivalente agrupada contenía 2  $\mu$ g de cada PS o 6  $\mu$ g de polisacárido total. A un grupo de ratones se le administró la vacuna conjugada Prevnar®13 (que contiene 2,2  $\mu$ g de cada PS por dosis, excepto del 6B, que es de 4  $\mu$ g, para un total de 30,8  $\mu$ g de PPS) como control positivo para la comparación con las respuestas de anticuerpos inducidas por PCMV. También se inmunizó un grupo de ratones con los antígenos solos, es decir, con los trece antígenos polisacáridos no conjugados encontrados en el Prevnar®13 13-valente, a 2  $\mu$ g de cada polisacárido para un total de 26  $\mu$ g de polisacárido por dosis. Asimismo se incluyó un grupo de ratones naíf (no vacunados) como grupo de control negativo.

Aproximadamente 2,5 semanas (día 47) después de la tercera inmunización se sacrificaron todos los ratones y se les extrajo la sangre por punción cardíaca. Los sueros inmunes se analizaron mediante ELISA específicos de PPS para determinar las respuestas de anticuerpos IgG específicos de antígeno que reconocen PPS4, PPS18C y PPS23. Los títulos medios geométricos de anticuerpo (GMT) de IgG anti-PPS se calcularon a partir de los títulos de los sueros individuales de los animales inmunizados. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 3.

**Tabla 3. Títulos de anticuerpos de PCMV trivalentes de PPS18C/PPS4/PPS23-CRM197- $\epsilon$ PLL**

Grupos ( $\mu$ g de PPS total por dosis)	IgG anti-PPS4 GMT	IgG anti-PPS18C GMT	IgG anti-PPS23F GMT
6 $\mu$ g de PCMV trivalente de PPS agrupados-CRM197- $\epsilon$ PLL + alumbre	1974	905	905
26 $\mu$ g de 13 PPS (solo polisacáridos)	11	31	17
Prevnar®13	73517	7563	2560
Naíf	11	10	10

Como puede verse en la tabla 3, la PCMV agrupada que contiene  $\epsilon$ -PLL indujo un GMT anti-PPS4 179 veces más alto que el polisacárido solo, un GMT anti-PPS 18C 29 veces más alto que el polisacárido solo, y un GMT anti-PPS23F 53 veces más alto que el polisacárido solo. Estos GMT fueron 37 veces más bajos, 8,3 veces más bajos y 2,8 veces más bajos que los GMT de la vacuna conjugada Prevnar®13 para PPS4, PPS18C y PPS23F respectivamente. A pesar de que los títulos obtenidos a partir de la PCMV trivalente agrupada no fueron tan altos como los inducidos por la vacuna conjugada Prevnar®13, representaron una mejora espectacular en comparación con el uso del antígeno solo y las anteriores PCMV de polisacáridos neumocócicos sin PLL y con DNI como proteína matricial. Este estudio demuestra la viabilidad de usar la adición de politaciones en la formación de las PCMV para mejorar la inmunogenicidad, tanto de las vacunas multivalentes, como de las vacunas monovalentes. Además, la facilidad de producción de las vacunas multivalentes mediante la tecnología PCMV, en comparación con la producción de las vacunas conjugadas usuales, es claramente ventajosa.

Ejemplo 6: PCMV 13-valente de polisacáridos neumocócicos agrupados

5 Se preparó una vacuna neumocócica 13-valente que contenía los antígenos polisacáridos neumocócicos actualmente incluidos en la vacuna conjugada Prevnar®13, es decir, PPS1, PPS3, PPS4, PPS5A, PPS6A, PPS19B, PPS19F, PPS19F y PPS19F y PPS19A y PPS19A, y se ensayó para investigar más a fondo los efectos beneficiosos de la adición de policlones a las mezclas de reacción formadoras de matrices de PCMV.

10 Se preparó una mezcla de reacción de PCMV que contenía 4 mg/ml de polisacárido total (aproximadamente 0,3 mg/ml de cada antígeno polisacárido), 4 mg/ml de CRM197 y 0,4 mg/ml de  $\epsilon$ -poli-L-lisina (4 kDa, Binafo Bioengineering Co. Ltd., Zhengzhou, PRC). El polisacárido y la  $\epsilon$ -poli-L-lisina se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, con una agitación continua de vaivén, antes de añadir glutaraldehído al 0,25% como agente reticulante y CRM197 como proteína matricial. Se siguió incubando durante 10 minutos más a temperatura ambiente, con vaivén constante, antes de poner la mezcla a 4°C durante 24 horas en agitación constante. La separación de la PCMV de PPS-CRM197- $\epsilon$ PLL se llevó a cabo en una columna Sephacryl S-1000 de 2,6 x 90 cm. Las fracciones se analizaron para determinar el polisacárido mediante el ensayo antrona, la proteína por MicroBCA y el atrapamiento de cada polisacárido en las partículas de PCMV por ELISA de captura. Las fracciones con contenido de polisacáridos de alto peso molecular que dieron positivo en el ELISA de captura se agruparon (véase figura 7, fracciones recuadradas), se les agregó alumbre como adyuvante, y se usaron para las inmunizaciones.

20 Se inmunizaron grupos de 10 ratones los días 0, 14 y 28, utilizando el régimen de dosificación descrito anteriormente. Cada dosis de PCMV 13-valente contenía 4  $\mu$ g de polisacárido total. La vacuna conjugada Prevnar® 13, que contiene 2,2  $\mu$ g de cada polisacárido por dosis, excepto de 6B, que es de 4  $\mu$ g para un total de 30,8  $\mu$ g de PPS, se administró a un grupo de ratones como control positivo para compararlo con las respuestas de anticuerpos inducidas por PCMV. También se inmunizó un grupo de ratones con los antígenos solos, es decir, con los trece antígenos polisacáridos no conjugados encontrados en el Prevnar®13 13-valente, con 2  $\mu$ g de cada polisacárido para 26  $\mu$ g de polisacárido total por dosis. Además se incluyó un grupo de ratones naif (no vacunados) como grupo de control negativo.

30 Aproximadamente 2,5 semanas (día 47) después de la tercera inmunización se sacrificaron todos los ratones y se les extrajo la sangre por punción cardíaca. Los sueros inmunes se analizaron mediante ELISA específico de PPS para determinar las respuestas de anticuerpos IgG específicos de antígeno a diez de los antígenos PPS. Los títulos medios geométricos (GMT) de los anticuerpos IgG anti-PPS se calcularon a partir de los títulos de los sueros individuales de animales inmunizados. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: títulos de anticuerpo de la PCMV 13-valente de PPS-CRM197-εPLL

Grupos (µg TOTALES por dosis)	IgG anti-PPS1 GMT	IgG anti-PPS3 GMT	IgG anti-PPS4 GMT	IgG anti-PPS6B GMT	IgG anti-PPS9V GMT	IgG anti-PPS1 GMT	IgG anti-PPS18C GMT	IgG anti-PPS19A GMT	IgG anti-PPS19F GMT	IgG anti-PPS23F GMT
4 µg de PCMV 13-valente de (PPS agrupados-CRM197-εPLL) + alumbre (~0,3 µg/PPS)	121	5820	6686	557	1667	512000	97006	3200	222861	139
26 µg de 13 PPS individuales combinados	15	17	11	48	20	4935	31	86	226	17
30,8 µg de vacuna Prevnar® 13 (~2 µg/PPS)	7760	11143	73517	970	134352	388023	7563	44110	33863	2560
Naif	10	17	11	14	26	10	10	17	10	10

El GMT de punto final de IgG surgido de los sueros de ratones inmunizados con formulaciones de PCMV agrupadas fue espectacularmente más alto que el GMT de ratones inmunizados con PPS solo (variando desde 8 hasta más de 3.000 veces mayor que con PPS solo). En los datos de la tabla 4 se puede ver que la PCMV 13-valente agrupada que contiene ε-PLL indujo un GMT de IgG comparable al GMT logrado con la inmunización con Prevnar®-13 (2 o 4 µg de cada PPS), dependiendo del PPS antígeno examinado, usando sustancialmente menos antígeno PPS (~0,3 µg/PPS en PCMV frente a 2 µg/µmg PPS en Prevnar®13).

Los datos inmunológicos de las tablas 3 y 4 anteriores ponen de manifiesto que las PCMV tri- y 13-valentes que llevan ε-PLL inducen unas respuestas inmunitarias de anticuerpos mucho más fuertes que las primeras PCMV sin contenido de PLL u otro polición. La reformulación con mayores niveles de reactivos y el fraccionamiento por tamaño de las PCMV para eliminar el antígeno o antígenos polisacáridos no incorporados y el monómero no reaccionado de la matriz proteica, p.ej. en una columna de mayor longitud, mejoró la respuesta inmune específica del antígeno en comparación con el antígeno solo. Además, la inclusión de los polímeros policationicos α-PLL y/o ε-PLL aumenta la eficiencia del atrapamiento del PS en la matriz PCMV-CRM-197 e induce una respuesta inmune 3 hasta 125 veces más fuerte en comparación con las formulaciones de PCMV-DNI que no incluyen α-PLL y ε-PLL (véase ejemplo 7). Como puede verse en las tablas anteriores, la respuesta de anticuerpos específicos de antígeno inducida por las PCMV formuladas con PLL es a veces inferior, parecida o superior a las respuestas inmunitarias a los PPS antígenos obtenidas con la vacuna conjugada Prevnar®13; no obstante, observando que las PCMV de PPS(13)-CRM197-εPLL llevan 0,3 µg de cada antígeno polisacárido por dosis en comparación con los 2 µg o 4 µg de cada antígeno PPS que lleva la vacuna conjugada Prevnar®13, se aprecia que las PCMV brindan una composición inmunógena excepcionalmente eficaz, que también se prepara eficientemente en una sola etapa de reacción (en comparación con la diversidad de reacciones de conjugación separadas que requiere la elaboración de la vacuna Prevnar®13).

Ejemplo 7: PCMV 13-valentes de PPS-DNI combinados y agrupados

Se preparó una serie de PCMV usando una forma mutante no tóxica del antígeno protector de *B. anthracis* (DNI) como proteína transportadora. Se sintetizaron por separado trece vacunas de matriz proteica con PPS/DNI, cada una de las cuales contenía un antígeno polisacárido neumocócico diferente (PPS), siguiendo el mismo procedimiento de reacción reticulante con glutaraldehído al 0,25%, tal como se ha descrito anteriormente. Las PCMV se separaron por tamaños en una columna de 2,6 x 15 cm de Sepharose CL2B. Además, se realizaron reacciones de reticulación de PCMV que contenían cuatro antígenos polisacáridos en la misma reacción de PCMV (antígenos agrupados), para producir PCMV multivalentes. Los PCMV multivalentes contenían los siguientes "paquetes" de antígenos:

- Paquete 1: PPS3, PPS18C, PPS19F, PPS23F
- Paquete 2: PPS4, PPS6A, PPS6B, PPS14
- Paquete 3: PPS5, PPS7F, PPS9V, PPS19A

El PPS 1 no se incluyó en las reacciones de PCMV agrupadas porque su estructura repetitiva contiene una amina primaria que puede reticularse covalentemente con la proteína transportadora en presencia de glutaraldehído. Las PCMV de antígenos agrupados se separaron por SEC de la misma manera que las PCMV monovalentes. Las trece composiciones de vacunas separadas se combinaron para formar la PCMV 13-valente de PPS-DNI. Las tres PCMV de antígenos agrupados, incluyendo la PCMV individual de PPS1-DNI, también se combinaron para formar una PCMV 13-valente de paquetes agrupados. Luego se inmunizaron grupos de 10 ratones con el cóctel de PCMV monovalentes o con el cóctel de PCMV de antígenos agrupados. Con las PCMV monovalentes combinadas los ratones recibieron 2,2 µg o 6 µg de cada polisacárido. Sin embargo, con los paquetes agrupados solo se administraron 0,5 µg de cada polisacárido en cada dosis, excepto el PPS1, del cual se administraron 2,2 µg. Como controles se inmunizaron grupos de ratones con los 13 polisacáridos solos o con la vacuna conjugada Prevnar®13. Cada dosis de Prevnar® contenía 2 µg de cada polisacárido, excepto de PPS6B, cuyo contenido era de 4 µg. La siguiente tabla 5 presenta un resumen de los títulos de anticuerpos anti-PPS de ratones inmunizados con las PCMV combinadas y de paquetes agrupados.

**Tabla 5. Títulos de anticuerpos anti-PPS de PCMV 13-valentes combinadas**

Grupos (dosis indicada = µg de cada PPS)	GMT de IgG anti-PPS					
	1	3	4	5	6A	6B
<b>2,2 µg de PCMV combinadas</b>	1140	94	98	79	251	127
<b>2,2 µg de PCMV de paquetes agrupados</b>	3318	106	90	198	396	280
<b>2,2 µg de PPS 13-valentes solos</b>	29	26	25	23	24	25
<b>6 µg de PCMV combinadas</b>	97	68	49	59	177	96
<b>6 µg de PPS 13-valentes solos</b>	24	28	25	32	37	25
<b>Prevnar-13</b>	16225	15308	19096	804	4543	3708
<b>Naíf</b>	25	28	24	24	25	24

(Tabla 5, continuación)

Grupos (dosis indicada = µg de cada PPS)	GMT de IgG anti-PPS						
	7F	9V	14	18C	19A	19F	23F
<b>2,2 µg de PCMV combinadas</b>	91	285	42759	207	1107	1678	134
<b>2,2 µg de PCMV de paquetes agrupados</b>	119	50	73069	512	1407	7258	357
<b>2,2 µg de PPS 13-valentes solos</b>	31	23	657	25	24	23	23
<b>6 µg de PCMV combinadas</b>	49	110	22696	209	229	441	64
<b>6 µg de PPS 13-valentes solos</b>	29	25	970	25	25	24	21
<b>Prevna-13</b>	11492	103612	171603	4789	25634	29182	766
<b>Naíf</b>	25	33	21	25	25	25	25

5 Ambos "cócteles" de PCMV indujeron títulos específicos de antígenos polisacáridos superiores a los inducidos por los antígenos polisacáridos por separado; sin embargo fueron 2 hasta 200 veces inferiores a los títulos provocados por la vacuna conjugada Prevna®13 (Pfizer Inc., EUA). Los resultados demuestran que la formación de PCMV de antígenos agrupados produjo mayores títulos de anticuerpos para casi todos los antígenos en comparación con la inmunización con las PCMV monovalentes combinadas. La menor respuesta inmunitaria a los cócteles de PCMV en comparación con Prevna®13 se debió probablemente a un mal atrapamiento de los polisacáridos y a la separación de las PCMV del polisacárido libre, más que a la cantidad de polisacárido administrada por dosis.

#### Ejemplo 8: PCMV trivalentes de PPS agrupados-CRM197-αPLL con flagelina añadida

15 Se preparó una PCMV trivalente que contenía los antígenos polisacáridos neumocócicos PPS4, 18C y 23F y CRM197 como proteína transportadora constitutiva de la matriz y poli-L-lisina, con y sin flagelina. Las PCMV se prepararon del siguiente modo: la mezcla reactiva de PCMV contenía 4 mg/ml de polisacárido total (1,33 mg/ml de cada polisacárido), 4 mg/ml de CRM197 y αPLL al 0,01% (150-300 kDa). Los polisacáridos y la αPLL se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, agitando con vaivén continuo, antes de añadir glutaraldehído al 0,25%. También se agregaron 0,001 mg/ml de flagelina de *Salmonella Typhimurium* (InvivoGen, San Diego, CA, EUA) a una mezcla reactiva de PCMV con el glutaraldehído. Se continuó incubando durante 30 minutos más a temperatura ambiente con agitación de vaivén continuo. Los productos de reacción de PCMV se separaron en una columna de 2,6 x 90 cm de Sephacryl S-1000 y las fracciones de alto peso molecular se recogieron y se agruparon (véase figura 8, fracciones recuadradas). Después de separar la reacción en la columna se determinaron los niveles de proteína y de polisacárido utilizando microBCA y el ensayo de antrona, respectivamente.

25 Se inmunizaron grupos de 10 ratones como en los ejemplos anteriores, utilizando la PCMV de antígenos agrupados sin flagelina o la PCMV de antígenos agrupados con flagelina. Los controles positivos y negativos fueron los mismos que en los ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en la tabla 6.

30 **Tabla 6. Títulos de anticuerpo anti-PPS de PCMV trivalentes de PPS agrupados-CRM197**

Grupos (µg de PPS total por dosis, o ~2 µg de cada PPS)	GMT de IgG anti-PPS4	GMT de IgG anti-PPS18C	GMT de IgG anti-PPS23F
6 µg de PCMV trivalente agrupada (PPS-CRM197-αPLL) + alumbre	885.124	76.392	260
6 µg de PCMV trivalente agrupada (PPS-CRM197-αPLL-flagelina) + alumbre	1.406.158	97.942	61
46 µg de Pneumovax® (polisacáridos solos)	15	25	19
30,8 µg de Prevna®13	80.305	3.448	1.194
Naíf	15	10	13

35 Con la PCMV que no contenía flagelina, los títulos de anticuerpos anti-PPS4 y PPS18 fueron 59.000 veces y 3.055 veces más altos que con el polisacárido solo y 11 veces y 22 veces más altos que con Prevna®13, respectivamente, a una dosis comparable (véase tabla 7). Los títulos inducidos por el PPS23F fueron algo más altos que los inducidos por el polisacárido solo, pero menos que los inducidos por Prevna®, lo cual sugiere que los niveles de atrapamiento de PPS23F en las partículas de PCMV fueron bajos. Estos datos, comparados con los datos anteriores de las PCMV trivalentes de PPS-CRM197-εPLL (véase ejemplo 5), indican que el uso de una αPLL de mayor peso molecular como polimerización mejoró el atrapamiento del antígeno en la matriz de PCMV y que la selección adecuada de antígenos para ser co-atrapados en la matriz proteica, la eliminación de especies no inmunógenas p.ej. mediante exclusión de tamaños de los componentes de bajo peso molecular del producto de reacción formador de la matriz, el empleo conveniente de elementos adyuvantes, p.ej. de flagelina, y el control apropiado de la cantidad de antígeno atrapado y dosificable

proporciona composiciones vacunales tipo PCMV de inmunogenicidad comparable e incluso superior a los productos vacunales conjugadas actualmente comercializados.

Ejemplo 9: PCMV 23-valentes de PPS-CRM197

Viendo la mejora del atrapamiento de polisacáridos y la inmunogenicidad observada al usar  $\alpha$ -PLL (150-300 kDa) en la PCMV trivalente de PPS, se preparó una PCMV 23-valente de PPS empleando los 23 polisacáridos de la vacuna comercial Pneumovax®. Una vez desalados y concentrados hasta 4 mg/ml (0,17 mg/ml de cada polisacárido), los 23 polisacáridos de Pneumovax® se incubaron con un 0,01% de  $\alpha$ -PLL (150-300 kDa) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación de vaivén constante. Se añadió glutaraldehído al 0,25% junto con 4 mg/ml de CRM197 y se siguió incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación de vaivén constante, antes de incubar a 4°C durante 24 horas con vaivén constante. La reacción de PCMV se separó en una columna de 2,6 cm x 90 cm de Sephacryl S-1000 y se determinó la cantidad de polisacárido total y de proteína en las fracciones utilizando el ensayo de antrona y el ensayo microBCA, respectivamente (figura 9). Las fracciones de alto peso molecular indicadas por el recuadro de la figura 9 se agruparon y se usaron para las inmunizaciones. Se inmunizaron grupos de 10 ratones como en los ejemplos anteriores. Los controles positivos y negativos fueron los mismos de los ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. GMT anti-PPS de PCMV 23-valentes de PPS-CRM197- $\alpha$ -PLL (150-300 kDa)**

Grupos ( $\mu$ g de PPS total por dosis, o $\sim$ 26 $\mu$ g de cada PPS)	GMT de IgG anti-PPS1	GMT de IgG anti-PPS3	GMT de IgG anti-PPS4	GMT de IgG anti-PPS6B	GMT de IgG anti-PPS9V
6 $\mu$ g de PCMV 23-valente agrupada (PPS-CRM197- $\alpha$ PLL) + alumbre	1.731.183	106.649	334	735	59.714
6 $\mu$ g de Pneumovax® (polisacáridos solos)	145	215	19	149	32
30,8 $\mu$ g de Plevnar®13 ( $\sim$ 2 $\mu$ g de cada PPS)	22.286	146.269	80.305	4.159	362.039
Naíf	11	13	15	13	10

(Tabla 7, continuación)

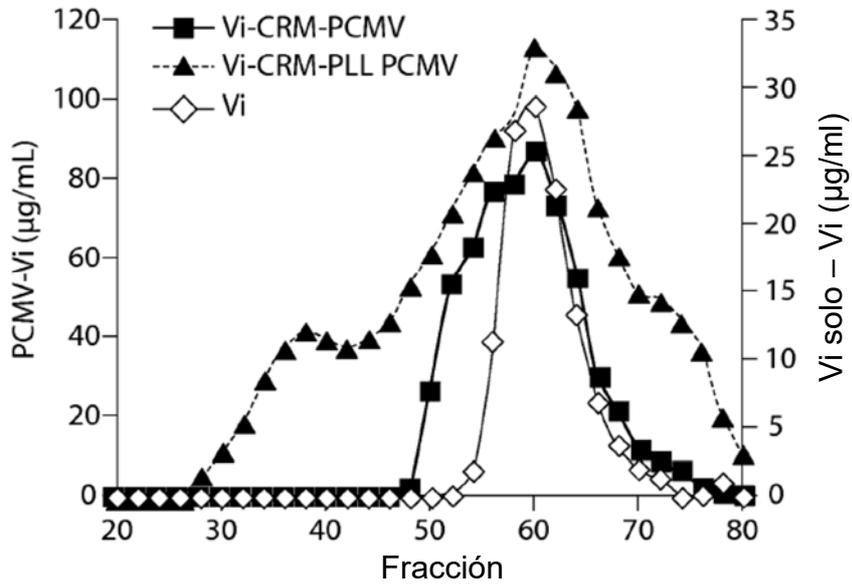
Grupos ( $\mu$ g de PPS total por dosis, o $\sim$ 26 $\mu$ g de cada PPS)	GMT de IgG anti-PPS14	GMT de IgG anti-PPS18C	GMT de IgG anti-PPS19A	GMT de IgG anti-PPS19F	GMT de IgG anti-PPS23F
6 $\mu$ g de PCMV 23-valente agrupada (PPS-CRM197- $\alpha$ PLL) + alumbre	1.891.038	463.425	1.372	2.492	53
6 $\mu$ g de Pneumovax® (polisacáridos solos)	1.030	70	20	61	70
30,8 $\mu$ g de Plevnar®13 ( $\sim$ 2 $\mu$ g de cada PPS)	383.957	3.448	24.251	3.378	1.194
Naíf	17	10	17	16	13

Las PCMV 23-valentes de PPS indujeron GMT para PPS1, PPS14 y PPS18C que fueron 77 veces, 4,9 veces y 134 veces más altos que los inducidos por la vacuna conjugada Plevnar®13, mientras que los GMT para PPS3 y PPS19F fueron equivalentes a los inducidos por Plevnar®13. Con las PCMV 23-valentes según la presente invención, solo se administraron 0,26  $\mu$ g de cada polisacárido por dosis, mientras que cada dosis de Plevnar®13 contiene 2,2  $\mu$ g de cada polisacárido (excepto del PPB6B, que es de 4  $\mu$ g), lo cual indica que el PCMV 23-valente fue capaz de inducir títulos más altos que la Plevnar®13 para varios polisacáridos a una dosis 7 veces menor. Aunque los GMT para los otros polisacáridos analizados en este ensayo de inmunogenicidad fueron inferiores a los inducidos por Plevnar®13, en general aún eran más altos que con el polisacárido solo.

REIVINDICACIONES

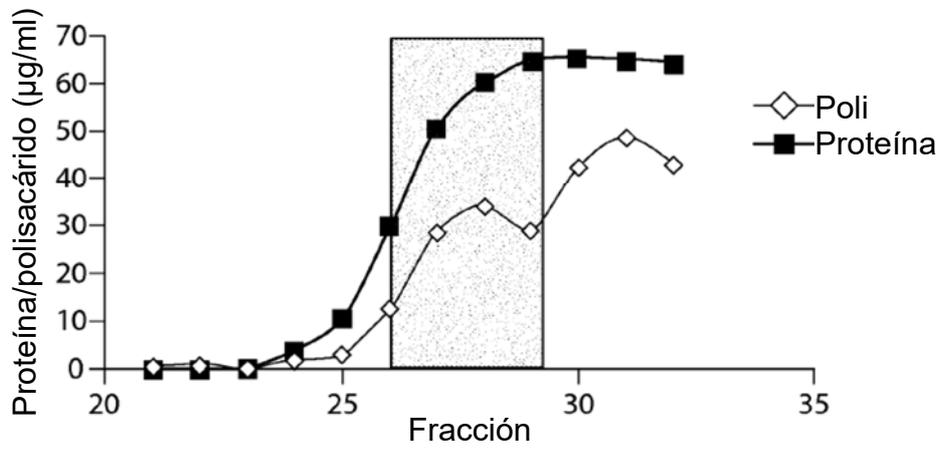
1. Un método para producir una composición inmunógena que lleva un antígeno útil atrapado en la matriz de proteína transportadora/policación, el cual está unido de forma no covalente a dicha matriz de proteína transportadora/policación; dicho método consiste en
- 5 (i) mezclar un antígeno útil - elegido del grupo formado por un polisacárido, un polialcohol como forma hidrogenada de un carbohidrato, en el cual un grupo carbonilo se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario, y un homopolímero de aminoácido - con una proteína transportadora y un policación para formar una mezcla;
- 10 (ii) añadir un conector que reticule dicha proteína transportadora y dicho policación mediante los grupos sulfhidrilo, amino o carboxilo de la proteína transportadora y del policación, y
- (iii) reticular dicha proteína transportadora y dicho policación para formar una matriz de proteína transportadora/policación.
2. El método de la reivindicación 1, en que dicho policación se escoge del grupo formado por: poli-L-lisina, poli-L-arginina, polietilenimina ramificada (PEI), espermidina, espermina, quitosano [copolímero unido por enlace  $\beta$ -(1-4) de 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucano (GlcN), poliamina N7 (CAS 29320-38-5) y etilendiaminometil poliestireno (CAS 177987-93-8).
3. El método de la reivindicación 2, en el cual dicho policación es poli-L-lisina (PLL), p.ej.  $\alpha$ -poli-L-lisina ( $\alpha$ -PLL) o  $\epsilon$ -poli-L-lisina ( $\epsilon$ -PLL), preferiblemente  $\alpha$ -poli-L-lisina.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el cual dicha composición consta de partículas de matriz proteica que tienen un tamaño medio de partícula superior a 50 nm de diámetro, p.ej. de 100 nm - 2000 nm.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la relación molar del antígeno a la proteína transportadora está comprendida entre 1 a 10 y 10 a 1.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el porcentaje en peso de policación en la mezcla reactiva es del 0,005 al 0,10%.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual dicho antígeno útil comprende dos o más antígenos.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual dicho antígeno útil es un polisacárido, por ejemplo un polisacárido seleccionado del grupo formado por un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*, un polisacárido de *Francisella tularensis*, un polisacárido de *Bacillus anthracis*, un polisacárido de *Haemophilus influenzae*, un polisacárido de *Salmonella Typhi*, un polisacárido de *Citrobacter freundii*, un polisacárido de especies de *Salmonella*, un polisacárido de *Shigella* o un polisacárido de *Neisseria meningitidis*.
9. El método de la reivindicación 8, en el cual dicho polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* se elige del grupo formado por los de tipo capsular 3, 4, 6B, 7A, 7B, 7C, 7F, 9A, 9L, 9N, 9V, 12A, 12B, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 17, 18B, 18C, 19F, 23F, 25A, 25F, 33F, 35, 37, 38, 44 y 46.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la proteína o proteínas transportadoras se eligen del grupo formado por toxoide diftérico, CRM197, toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o un mutante de la misma, subunidad B de la toxina del cólera, fragmento C de la toxina tetánica, flagelina bacteriana, neumolisina, una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, proteína Hcp1 de *Pseudomonas aeruginosa*, enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, toxina tipo shiga, proteína LTB humana, listeriolisina O, un extracto proteico de células bacterianas completas, el inhibidor negativo dominante (DNI) mutante del antígeno protector de *Bacillus anthracis*, o beta-galactosidasa de *Escherichia coli*.

**Comparación de PCMV preparadas con y sin PLL**



**Fig. 1**

**PCMV de Vi-CRM-PLL (0,1 mg/ml)  
separada en columna S-1000 de 2,6 x 30 cm**



**Fig. 2**

Separación mejor de PCMV Vi-CRM-PLL en columna S-1000 de 2,6 x 90 cm

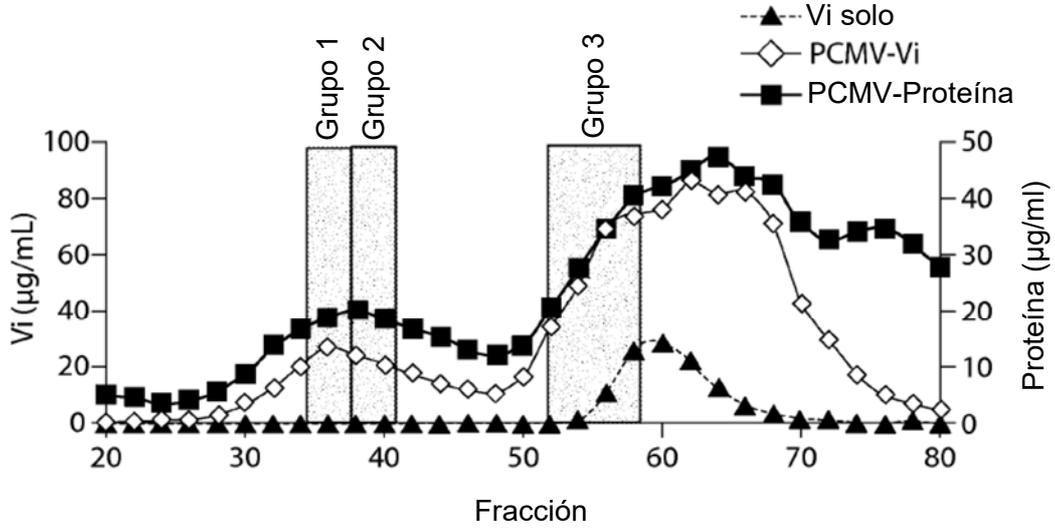


Fig. 3

PCMV de PPS18C-CRM-0,4 mg/ml de PLL (15-30 kDa)

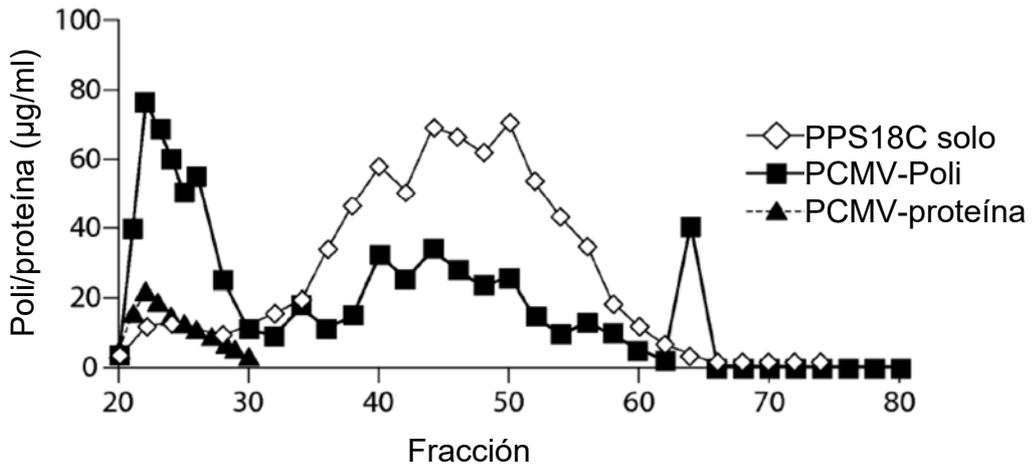
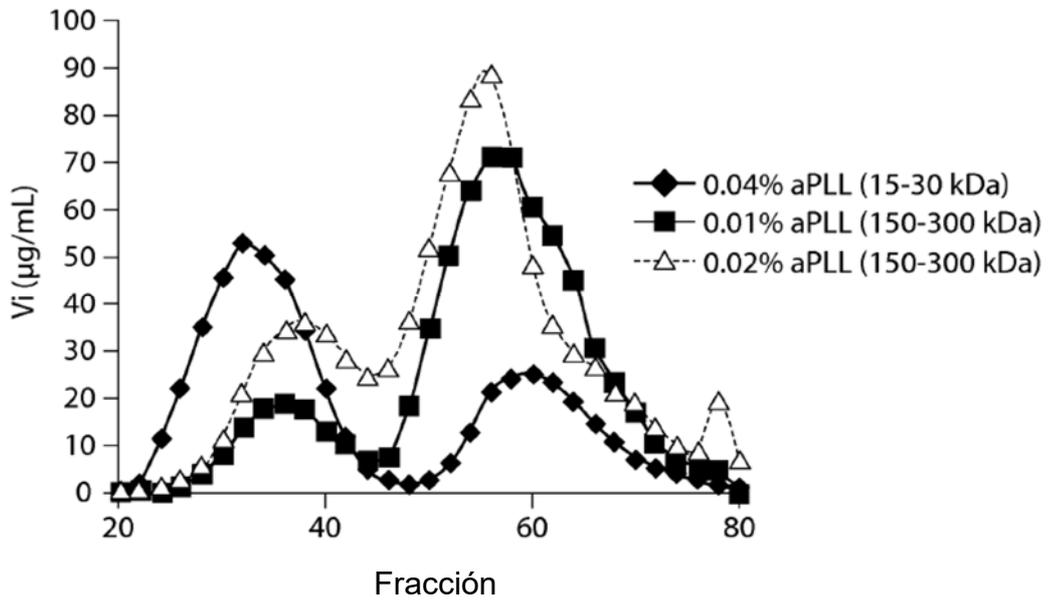


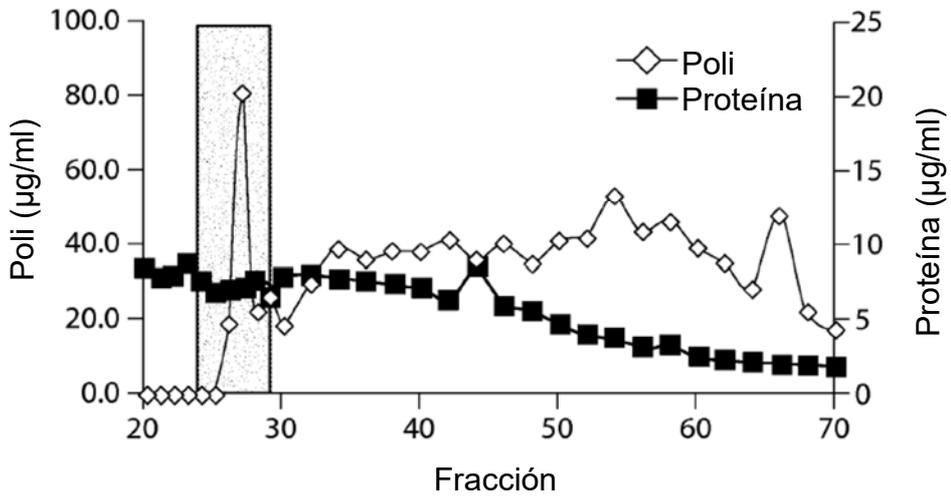
Fig. 4

**Mejor atrapamiento de Vi con el aumento de PLL**



**Fig. 5**

**PCMV trivalente de PPS-CRM-ePLL**



**Fig. 6**

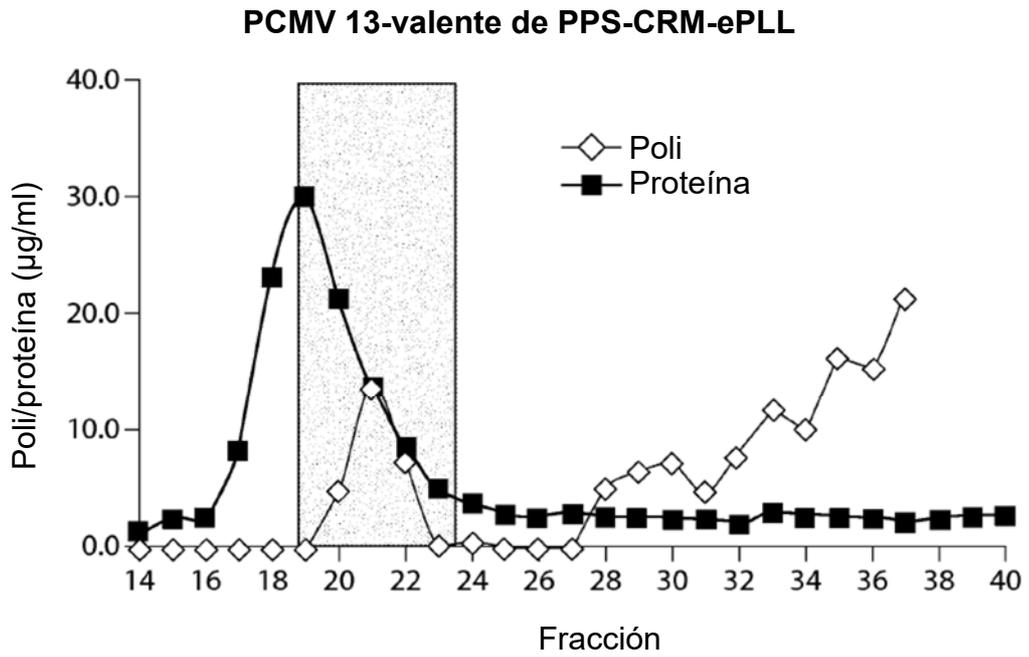


Fig. 7

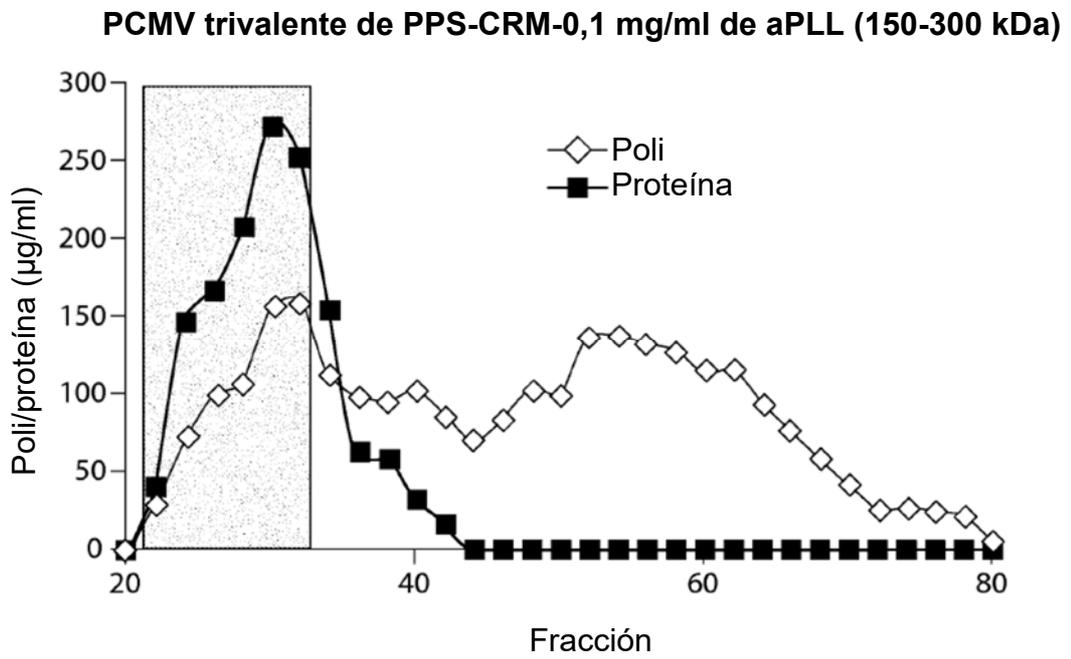


Fig. 8

PCMV 23-valente de PPS-CRM-aPLL (150-300 kDa)

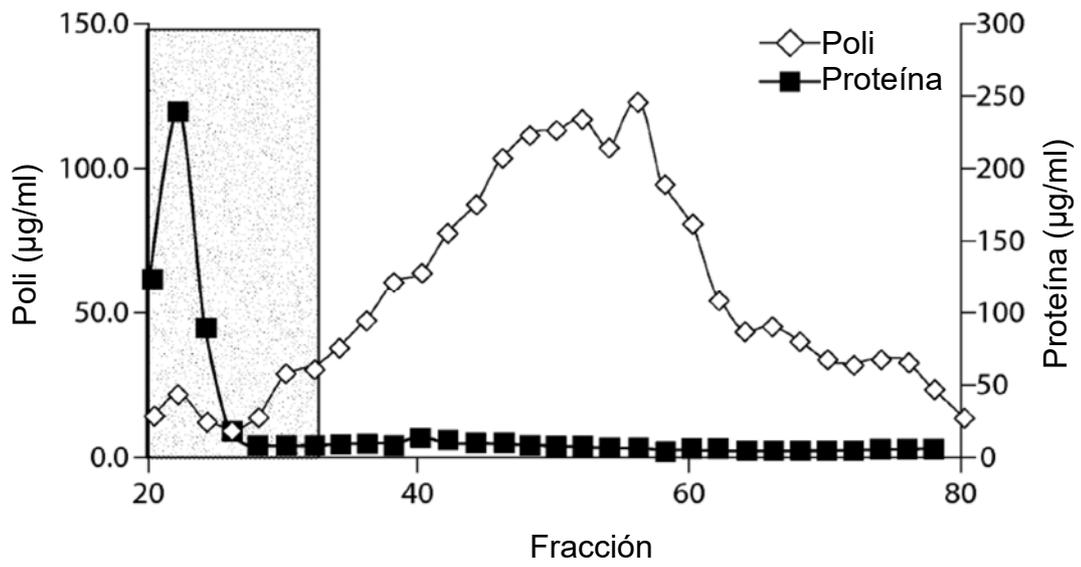


Fig. 9