



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No. 03-27877

54 TÍTULO VACUNA de antígenos polisacáridos
bacterianos" (folio 707 - cambio título)

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A 61K 39/09

71 SOLICITANTE SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS SA.

DOMICILIO Rued Institute 89, B-7230 Rixensart, Bélgica

74 APODERADO CARLOS R OLARTE

22 BOGOTÁ, D. C., MARZO 14, 2003

03 021871 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación 03021871 00000000

Folios 33

Fecha (AED) 2003-03-14 16:51:23

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 8029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIAFORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I

☒

Capítulo II

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S A

Dirección Rue de l Institute 89 B 1330 Rixensart Belgica

Nacionalidad o Domicilio Belga

Lugar de Constitución Belgica

Teléfono

Fax

E Mail

IDENTIFICACION

C C

☐

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre CARLOS R OLARTE

Dirección Avda 82 No 10-62 Piso 6

Teléfono 634-1500

Fax 376-2211

E Mail patents bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C C

☒

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Número 79 782 747 Bú TP 74.295

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre CRAIG A J LAFERRIERE, JAN POOLMAN

Dirección Rue de l Institute 89 B-1330 Rixensart, Belgica

Nacionalidad o Domicilio CANADIENSE, HOLANDESA

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No PCT/EP01/10568

Fecha Septiembre 12, 2001

Publicación Internacional No WO 02/22167

Fecha Marzo 21 2002

⑥ Título (84)

VACUNA Nuevo titulo " Vacuna de antígenos polisacáridos bacterianos" folio 101.

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/09; 39/385

⑧

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

Septiembre 15 2000

(31) Número de Solicitud

0022742 I

⑨

Comprobante de pago No 58,407, 58,408, 8,107, 8,381

Fecha 17-09-01, 07-02-03

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE CARLOS R. OLARTE

FIRMA

C C 79 782 747 de Btá T P 74295

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 01 - 58,407
 FECHA SEPTIEMBRE 17 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6526576	17/09/2001	32 194,800 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES	190 080 00
		12 MARCAS Y LEÑAS COMERCIALES	190 080 00
		TOTAL	\$ 190,080 00

SON: CIENTO NOVENTA MIL OCHENTA PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
 Conmutador 382 0840
 Fax 350 5220
 E-mail info@slc.gov.co
 www.slc.gov.co
 Bogotá D C Colombia

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 01 - 58,408
FECHA 1 SEPTIEMBRE 17 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6326376	17/09/2001	32 194,800 00

***** C O N C E P T O *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES	
		12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	190,080 00
		TOTAL	\$ 190,080 00

SON CIENTO NOVENTA MIL OCHENTA PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D C Colombia

5

CERTIFICACION DE EXCEDENTE 03 - 8 107
FECHA FEBRERO 7 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
ALVARO CORREA ORDONEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9010333	07/02/2003	40,214,000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	3 000 00
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	3 000 00
		TOTAL :	6 000 00

SON: TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

6

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 8,361
FECHA FEBRERO 7 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
ALVARO CORREA ORDONEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9010333	07/02/2003	40,214,000

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA AND ANTR
		TOTAL	\$ 17,000 00

SON DIEZ Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 March 2002 (21 03 2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22167 A2

(51) International Patent Classification⁷ A61K 39/09
39/385 A61P 31/04

(21) International Application Number PCT/EP01/10568

(22) International Filing Date:
12 September 2001 (12.09.2001)

(25) Filing Language English

(26) Publication Language English

(30) Priority Data
0022742.1 15 September 2000 (15.09.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US)
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
[BE/BE], Rue de l'Institut 89 B 1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors, and

(75) Inventors/Applicants (for US only) LAFERRIERE,
Craig, Antony, Joseph [CA/BE] GlaxoSmithKline Bio-
logicals S.A., Rue de l'Institut 89 B 1330 Rixensart (BE).
POOLMAN, Jan [NL/BE] GlaxoSmithKline Biologicals
S.A. Rue de l'Institut 89 B 1330 Rixensart (BE).

(74) Agent LUBIENSKI, Michael, John GlaxoSmithKline
Corporate Intellectual Property (CN9 25 1) 980 Great
West Road, Brumford, Middlesex TW8 9GX (GB)

(81) Designated States (national) AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW

(84) Designated States (regional) ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

Published.

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title VACCINE

(57) Abstract: The present invention relates to the field of bacterial polysaccharide antigen vaccines. In particular the present invention relates to vaccines comprising a pneumococcal polysaccharide antigen, typically a pneumococcal polysaccharide conjugate antigen from *Streptococcus pneumoniae* selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 and optionally a Th1 inducing adjuvant.

WO 02/22167 A2

VACCINE

FIELD OF INVENTION

The present invention relates to bacterial polysaccharide antigen vaccines,
5 their manufacture and the use of such polysaccharides in medicines.

In particular the present invention relates to vaccines comprising a
pneumococcal polysaccharide antigen, typically a pneumococcal polysaccharide
conjugate antigen, formulated with a protein antigen from *Streptococcus pneumoniae*
and optionally a Th1 inducing adjuvant.

10

BACKGROUND OF INVENTION

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacteria responsible for
considerable morbidity and mortality (particularly in the young and aged), causing
invasive diseases such as pneumonia, bacteremia and meningitis, and diseases
15 associated with colonisation, such as acute Otitis media. The rate of pneumococcal
pneumonia in the US for persons over 60 years of age is estimated to be 3 to 8 per
100,000. In 20% of cases this leads to bacteremia, and other manifestations such as
meningitis, with a mortality rate close to 30% even with antibiotic treatment.

Pneumococcus is encapsulated with a chemically linked polysaccharide which
20 confers serotype specificity. There are 90 known serotypes of pneumococci, and the
capsule is the principle virulence determinant for pneumococci, as the capsule not
only protects the inner surface of the bacteria from complement, but is itself poorly
immunogenic. Polysaccharides are T-independent antigens, and can not be processed
or presented on MHC molecules to interact with T-cells. They can however, stimulate
25 the immune system through an alternate mechanism which involves cross-linking of
surface receptors on B cells.

It was shown in several experiments that protection against invasive
pneumococci disease is correlated most strongly with antibody specific for the
capsule, and the protection is serotype specific.

30 Polysaccharide antigen based vaccines are well known in the art. Four that
have been licensed for human use include the Vi polysaccharide of *Salmonella typhi*,
the PRP polysaccharide from *Haemophilus influenzae*, the tetravalent meningococcal

vaccine composed of serotypes A, C, W135 and Y, and the 23-Valent pneumococcal vaccine composed of the polysaccharides corresponding to serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, and 33 (accounting for at least 90% of pneumococcal blood isolates).

5 The latter three vaccines confer protection against bacteria causing respiratory infections resulting in severe morbidity and mortality in infants, yet these vaccines have not been licensed for use in children less than two years of age because they are inadequately immunogenic in this age group [Peltola *et al* (1984), *N Engl J Med.* 310 1561-1566] *Streptococcus pneumoniae* is the most common cause of invasive
10 bacterial disease and otitis media in infants and young children. Likewise, the elderly mount poor responses to pneumococcal vaccines [Roghmann *et al*, (1987), *J Gerontol.* 42 265-270], hence the increased incidence of bacterial pneumonia in this population [Verghese and Berk, (1983) *Medicine (Baltimore)* 62 271-285]

Strategies, which have been designed to overcome this lack of
15 immunogenicity in infants, include the linking of the polysaccharide to large immunogenic proteins, which provide bystander T-cell help and which induce immunological memory against the polysaccharide antigen to which it is conjugated. Pneumococcal glycoprotein conjugate vaccines are currently being evaluated for safety, immunogenicity and efficacy in various age groups

20 The 23-valent unconjugated pneumococcal vaccine has shown a wide variation in clinical efficacy, from 0% to 81% (Fedson *et al* (1994) *Arch Intern Med.* 154 2531-2535). The efficacy appears to be related to the risk group that is being immunised, such as the elderly, Hodgkin's disease, splenectomy, sickle cell disease and agammaglobulinemics (Fine *et al* (1994) *Arch Intern Med.* 154 2666-2677), and
25 also to the disease manifestation. The 23-valent vaccine does not demonstrate protection against pneumococcal pneumonia (in certain high risk groups such as the elderly) and otitis media diseases.

There is therefore a need for improved pneumococcal vaccine compositions, particularly ones which will be more effective in the prevention or amelioration of
30 pneumococcal disease (particularly pneumonia) in the elderly and in young children.

The present invention provides such an improved vaccine.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly the present invention provides a vaccine composition, comprising at least one *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen (preferably conjugated to a protein carrier) and a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of Poly Histidine Triad family (Pht; e.g. PhtA, PhtB, PhtD, or PhtE), Lyt family (e.g. LytA, LytB, or LytC), SpaA, Sp128, Sp130, Sp125, Sp101 and Sp133, or truncate or immunologically functional equivalent thereof, optionally with a Th1 adjuvant (an adjuvant inducing a predominantly Th1 immune response). Preferably both a pneumococcal protein and Th1 adjuvant are included. Advantageous compositions comprising combinations of the above pneumococcal proteins of the invention with each other and with other pneumococcal proteins are also described. The compositions of the invention are particularly suited in the treatment of elderly pneumonia.

Pneumococcal polysaccharide vaccines (conjugated or not) may not be able to protect against pneumonia in the elderly population for which the incidence of this disease is very high. The key defense mechanism against the pneumococcus is opsonophagocytosis (a humoral B-cell / neutrophil mediated event caused by the production of antibodies against the pneumococcal polysaccharide, the bacterium eventually becoming phagocytosed), however parts of the involved opsonic mechanisms are impaired in the elderly, i.e. superoxide production by PMN (polymorphonuclear cells), other reactive oxygen species production, mobilization of PMN, apoptosis of PMN, deformability of PMN. Antibody responses may also be impaired in the elderly.

Contrary to the normally accepted dogma, normal levels of anti-capsular polysaccharide antibodies may not be effective in complete clearance of bacteria, as pneumococci may invade host cells to evade this branch of the immune system.

Surprisingly, the present inventors have found that by simultaneously stimulating the cell mediated branch of the immune system (for instance T-cell mediated immunity) in addition to the humoral branch of the immune system (B-cell mediated), a synergy (or cooperation) may result which is capable of enhancing the clearance of pneumococci from the host. This is a discovery which will aid the

prevention (or treatment) of pneumococcal infection in general, but will be particularly important for the prevention (or treatment) of pneumonia in the elderly where polysaccharide based vaccines do not show efficacy

Without wishing to be bound by any theory, the present inventors have found that both arms of the immune system may synergise in this way if a pneumococcal polysaccharide (preferably conjugated to a protein carrier) is administered with a pneumococcal protein selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 (proteins which can be processed and presented in the context of Class II and MHC class I on the surface of infected mammalian cells) Although one or more of these pneumococcal proteins can trigger cell mediated immunity by itself, the inventors have also found that the presence of a Th1 inducing adjuvant in the vaccine formulation helps this arm of the immune system, and surprisingly further enhances the synergy between both arms of the immune system.

15

DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides an improved vaccine particularly for the prevention or amelioration of pneumococcal infection of the elderly (and/or infants and toddlers)

20

In the context of the invention a patient is considered elderly if they are 55 years or over in age, typically over 60 years and more generally over 65 years.

Thus in one embodiment of the invention there is provided a vaccine composition, suitable for use in the elderly (and/or Infants and toddlers) comprising at least one *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein antigen(s) selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 The vaccine may optionally comprise a Th1 adjuvant.

25

In a second, preferred, embodiment, the present invention provides a vaccine (suitable for the prevention of pneumonia in the elderly) comprising at least one (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10) *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen(s) and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of:

30

10

PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and, preferably, a Th1 adjuvant.

In the above embodiments vaccines advantageously comprising combinations of the above pneumococcal proteins of the invention with each other and with other pneumococcal proteins are also envisioned as described below

It is envisaged that such a vaccine will be also useful in treating pneumococcal infection (for instance otitis media) in other high risk groups of the population, such as for infants or toddlers

10 *Streptococcus pneumoniae Polysaccharide Antigens of the Invention*

Typically the *Streptococcus pneumoniae* vaccine of the present invention will comprise polysaccharide antigens (preferably conjugated to a carrier protein), wherein the polysaccharides are derived from at least four serotypes of pneumococcus. Preferably the four serotypes include 6B, 14, 19F and 23F. More preferably, at least 7 serotypes are included in the composition, for example those derived from serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F. More preferably still, at least 11 serotypes are included in the composition, for example the composition in one embodiment includes capsular polysaccharides derived from serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F (preferably conjugated to a carrier protein). In a preferred embodiment of the invention at least 13 polysaccharide antigens (preferably conjugated to a carrier protein) are included, although further polysaccharide antigens, for example 23 valent (such as serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F and 33F), are also contemplated by the invention.

For elderly vaccination (for instance for the prevention of pneumonia) it is advantageous to include serotypes 8 and 12F (and most preferably 15 and 22 as well) to the 11 valent antigenic composition described above to form a 15 valent vaccine, whereas for infants or toddlers (where otitis media is of more concern) serotypes 6A and 19A are advantageously included to form a 13 valent vaccine

Although the above polysaccharides may be used in their full-length, native form, it should be understood that size-reduced polysaccharides may also be used which are still immunogenic (see for example EP 497524 and 497525).

For the prevention/amelioration of pneumonia in the elderly (+55 years) population and Otitis media in Infants (up to 18 months) and toddlers (typically 18 months to 5 years), it is a preferred embodiment of the invention to combine a multivalent *Streptococcus pneumonia* polysaccharide as herein described with a *Streptococcus pneumoniae* protein selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, or immunologically functional equivalent thereof. A combination of pneumococcal proteins may also be advantageously utilised as described below

Pneumococcal Proteins of the invention

For the purposes of this invention, "immunologically functional equivalent" is defined as a peptide or protein comprising at least one protective epitope from the proteins of the invention. Such epitopes are characteristically surface-exposed, highly conserved, and can elicit an bactericidal antibody response in a host or prevent toxic effects. Preferably, the functional equivalent has at least 15 and preferably 30 or more contiguous amino acids from the protein of the invention. Most preferably, fragments, deletions of the protein, such as transmembrane deletion variants thereof (ie the use of the extracellular domain of the proteins), fusions, chemically or genetically detoxified derivatives and the like can be used with the proviso that they are capable of raising substantially the same immune response as the native protein. The position of potential B-cell epitopes in a protein sequence may be readily determined by identifying peptides that are both surface-exposed and antigenic using a combination of two methods: 2D-structure prediction and antigenic index prediction. The 2D-structure prediction can be made using the PSIPRED program (from David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). The antigenic index can be calculated on the basis of the method described by Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

The proteins of the invention are the following proteins, all of which are exposed on the outer surface of the pneumococcus (capable of being recognised by a host's immune system during at least part of the life cycle of the pneumococcus), or are proteins which are secreted or released by the pneumococcus.

M

The *Streptococcus pneumoniae* protein of the invention is preferably selected from the group consisting of a protein from the polyhistidine triad family (Pht), a protein from the Lyt family, a choline binding protein, proteins having an LPXTG motif (where X is any amino acid), proteins having a Type II Signal sequence motif of LXXC (where X is any amino acid), and proteins having a Type I Signal sequence motif. Preferred examples within these categories (or motifs) are the following proteins (or truncate or immunologically functional equivalent thereof)

The Pht (Poly Histidine Triad) family comprises proteins PhtA, PhtB, PhtD, and PhtE. The family is characterised by a lipidation sequence, two domains separated by a proline-rich region and several histidine triads, possibly involved in metal or nucleoside binding or enzymatic activity, (3-5) coiled-coil regions, a conserved N-terminus and a heterogeneous C terminus. It is present in all strains of pneumococci tested. Homologous proteins have also been found in other Streptococci and *Neisseria*. Preferred members of the family comprise PhtA, PhtB and PhtD. More preferably, it comprises PhtA or PhtD. It is understood, however, that the terms Pht A, B, D, and E refer to proteins having sequences disclosed in the citations below as well as naturally-occurring (and man-made) variants thereof that have a sequence homology that is at least 90% identical to the referenced proteins. Preferably it is at least 95% identical and most preferably it is 97% identical.

With regards to the Pht proteins, PhtA is disclosed in WO 98/18930, and is also referred to Sp36. As noted above, it is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II signal motif of LXXC.

PhtD is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036D. As noted above, it also is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II LXXC signal motif.

PhtB is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036B. Another member of the PhtB family is the C3-Degrading Polypeptide, as disclosed in WO 00/17370. This protein also is from the polyhistidine triad family and has the type II LXXC signal motif. A preferred immunologically functional equivalent is the protein Sp42 disclosed in WO 98/18930. A PhtB truncate (approximately 79kD) is disclosed in WO99/15675 which is also considered a member of the PhtX family.

PhtE is disclosed in WO00/30299 and is referred to as BVH-3.

SpaA is a Choline binding protein (Cbp) disclosed in WO 98/39450

The Lyt family is membrane associated proteins associated with cell lysis
The N-terminal domain comprises choline binding domain(s), however the Lyt family
does not have all the features found in the choline binding protein family (Cbp) family
5 noted below and thus for the present invention, the Lyt family is considered distinct
from the Cbp family. In contrast with the Cbp family, the C-terminal domain contains
the catalytic domain of the Lyt protein family. The family comprises LytA, B and C.
With regards to the Lyt family, LytA is disclosed in Ronda et al., Eur J Biochem,
164 621-624 (1987). LytB is disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as
10 Sp46. LytC is also disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as Sp91. A
preferred member of that family is LytC.

Another preferred embodiment are Lyt family truncates wherein "Lyt" is
defined above and "truncates" refers to proteins lacking 50% or more of the Choline
binding region. Preferably such proteins lack the entire choline binding region.

15 Sp125 is an example of a pneumococcal surface protein with the Cell Wall
Anchored motif of LPXTG (where X is any amino acid). Any protein within this class
of pneumococcal surface protein with this motif has been found to be useful within
the context of this invention, and is therefore considered a further protein of the
invention. Sp125 itself is disclosed in WO 98/18930, and is also known as ZmpB - a
20 zinc metalloprotease.

Sp101 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85993). It is
characterised by a Type I signal sequence.

Sp133 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85992). It is
also characterised by a Type I signal sequence.

25 Sp128 and Sp130 are disclosed in WO 00/76540

The proteins used in the present invention are preferably selected from the
group PhtD and PhtA, or a combination of both of these proteins.

*Advantageous combination of one or more pneumococcal proteins of the invention
30 with other pneumococcal proteins*

In the vaccine of the invention, each of the above proteins of the invention
(preferably either or both of PhtD and PhtA) may also be beneficially combined with

one or more pneumococcal proteins from the following list pneumolysin (also referred to as Ply, preferably detoxified by chemical treatment or mutation) [WO 96/05859, WO 90/06951, WO 99/03884], PsaA and transmembrane deletion variants thereof (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec, 64(12) 5255-62), PspA and transmembrane deletion variants thereof (US 5804193, WO 92/14488, WO 99/53940), PspC and transmembrane deletion variants thereof (WO 97/09994, WO 99/53940), a member of the Choline binding protein (Cbp) family [e.g. CbpA and transmembrane deletion variants thereof (WO 97/41151, WO 99/51266)], Glyceraldehyde-3-phosphate - dehydrogenase (Infect. Immun. 1996 64 3544), HSP70 (WO 96/40928), PcpA (Sanchez-Beato et al. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164 207-14), M like protein (SB patent application No EP 0837130), and adhesin 18627 (SB Patent application No EP 0834568) The present invention also encompasses immunologically functional equivalents or truncates of such proteins (as defined above)

Concerning the Choline Binding Protein family, members of that family were originally identified as pneumococcal proteins that could be purified by choline-affinity chromatography All of the choline-binding proteins are non-covalently bound to phosphorylcholine moieties of cell wall teichoic acid and membrane-associated lipoteichoic acid. Structurally, they have several regions in common over the entire family, although the exact nature of the proteins (amino acid sequence, length, etc.) can vary In general, choline binding proteins comprise an N terminal region (N), conserved repeat regions (R1 and/or R2), a proline rich region (P) and a conserved choline binding region (C), made up of multiple repeats, that comprises approximately one half of the protein. As used in this application, the term "Choline Binding Protein family (Cbp)" is selected from the group consisting of Choline Binding Proteins as identified in WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, and CbpG CbpA is disclosed in WO 97/41151 CbpD and CbpG are disclosed in WO 00/29434 PspC is disclosed in WO 97/09994 PbcA is disclosed in WO 98/21337 Preferably the Choline Binding Proteins are selected from the group consisting of CbpA, PbcA, SpsA and PspC.

If a Cbp is the further protein utilised it may be a Cbp truncate wherein "Cbp" is defined above and "truncate" refers to proteins lacking 50% or more of the Choline

binding region (C). Preferably such proteins lack the entire choline binding region. More preferably, the such protein truncates lack (i) the choline binding region and (ii) a portion of the N-terminal half of the protein as well, yet retain at least one repeat region (R1 or R2). More preferably still, the truncate has 2 repeat regions (R1 and R2). Examples of such preferred embodiments are NR1xR2 and R1xR2 as illustrated in WO99/51266 or WO99/51188, however, other choline binding proteins lacking a similar choline binding region are also contemplated within the scope of this invention.

Cbp truncate-Lyt truncate chimeric proteins (or fusions) may also be used in the vaccine of the invention. Preferably this comprises NR1xR2 (or R1xR2) of Cbp and the C-terminal portion (Cterm, i.e., lacking the choline binding domains) of Lyt (e.g., LytCCterm or Sp91Cterm). More preferably Cbp is selected from the group consisting of CbpA, PbcA, SpaA and PspC. More preferably still, it is CbpA. Preferably, Lyt is LytC (also referred to as Sp91).

A PspA or PsaA truncate lacking the choline binding domain (C) and expressed as a fusion protein with Lyt may also be used. Preferably, Lyt is LytC.

Preferred combinations of pneumococcal proteins for the purposes of this invention

Preferably the combination of proteins of the invention are selected from 2 or more (3 or 4) different categories such as proteins having a Type II Signal sequence motif of LXXC (where X is any amino acid, e.g., the polyhistidine triad family (Pht)), choline binding proteins (Cbp), proteins having a Type I Signal sequence motif (e.g., Sp101), proteins having a LPXTG motif (where X is any amino acid, e.g., Sp128, Sp130), toxins (e.g., Ply), etc. Preferred examples within these categories (or motifs) are the proteins mentioned above, or immunologically functional equivalents thereof. Toxin + Pht, toxin + Cbp, Pht + Cbp, and toxin + Pht + Cbp are preferred category combinations.

Preferred beneficial combinations include, but are not limited to, PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm chimeric or fusion proteins, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm chimeric or fusion proteins, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 +

LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferably, NR1xR2 (or R1xR2) is from CbpA or PspC. More preferably it is from CbpA.

5 A particularly preferred combination of pneumococcal proteins comprises Ply (or a truncate or immunologically functional equivalent thereof) + PhtD (or a truncate or immunologically functional equivalent thereof) + NR1xR2 (or R1xR2). Preferably, NR1xR2 (or R1xR2) is from CbpA or PspC. More preferably it is from CbpA.

10 Without wishing to be bound by any theory, within the composition the pneumococcal protein (or combinations described above) of the invention can help to induce a T-cell mediated response against pneumococcal disease – particularly required for protection against pneumonia – which cooperates with the humoral branch of the immune system to inhibit invasion by pneumococci, and to stimulate
15 opsonophagocytosis. A further advantage of including the protein antigen is the presentation of further antigens for the opsonophagocytosis process.

Accordingly in an embodiment of the invention there is provided a *Streptococcus pneumoniae* vaccine comprising a pneumococcus polysaccharide conjugate vaccine comprising polysaccharide antigens derived from at least four
20 serotypes, preferably at least seven serotypes, more preferably at least eleven serotypes, and at least one, but preferably 2, 3, or 4, *Streptococcus pneumoniae* proteins selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 (or a pneumococcal protein combination as described above). Preferably one of the proteins is PhtA (or an
25 immunologically functional equivalent thereof). Most preferably one of the proteins is PhtD (or an immunologically functional equivalent thereof).

As mentioned above, a problem associated with the polysaccharide approach to vaccination, is the fact that polysaccharides *per se* are poor immunogens. To overcome this, polysaccharides may be conjugated to protein carriers, which provide
30 bystander T-cell help. It is preferred, therefore, that the polysaccharides utilised in the invention are linked to such a protein carrier. Examples of such carriers which are currently commonly used for the production of polysaccharide immunogens include

the Diphtheria and Tetanus toxoids (DT, DT CRM197 and TT respectively), Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), OMPC from *N meningitidis*, and the purified protein derivative of Tuberculin (PPD)

A preferred carrier for the pneumococcal polysaccharide based immunogenic compositions (or vaccines) is protein D from *Haemophilus influenzae* (EP 594610-B), or fragments thereof. Fragments suitable for use include fragments encompassing T-helper epitopes. In particular a protein D fragment will preferably contain the N-terminal 1/3 of the protein. A protein D carrier is surprisingly useful as a carrier in vaccines where multiple pneumococcal polysaccharide antigens are conjugated. Epitope suppression is usually likely to occur if the same carrier is used for each polysaccharide. Surprisingly, the present inventors have found protein D is particularly suitable for minimising such epitopic suppression effects in combination vaccines. One or more pneumococcal polysaccharides in a combination may be advantageously conjugated onto protein D, and preferably all antigens are conjugated onto protein D within such a combination vaccine.

A further preferred carrier for the pneumococcal polysaccharide is the pneumococcal protein itself (as defined above in section "Pneumococcal Proteins of the invention")

The polysaccharide may be linked to the carrier protein by any known method (for example, by Likhite, U S Patent 4,372,945 and by Armor *et al*, U S Patent 4,474,757). Preferably, CDAP conjugation is carried out (WO 95/08348)

Preferably the protein:polysaccharide (weight:weight) ratio of the conjugates is 0.3:1 to 1:1, more preferably 0.6:1 to 0.8:1, and most preferably about 0.7:1

The vaccines of the present invention are preferably adjuvanted. Suitable adjuvants include an aluminium salt such as aluminium hydroxide gel (alum) or aluminium phosphate, but may also be a salt of calcium, magnesium, iron or zinc, or may be an insoluble suspension of acylated tyrosine, or acylated sugars, cationically or anionically derivatised polysaccharides, or polyphosphazenes.

It is preferred that the adjuvant be selected to be a preferential inducer of a TH1 type of response to aid the cell mediated branch of the immune response

TH1 Adjuvants of the Invention

High levels of Th1-type cytokines tend to favour the induction of cell mediated immune responses to a given antigen, whilst high levels of Th2-type cytokines tend to favour the induction of humoral immune responses to the antigen.

It is important to remember that the distinction of Th1 and Th2-type immune response is not absolute. In reality an individual will support an immune response which is described as being predominantly Th1 or predominantly Th2. However, it is often convenient to consider the families of cytokines in terms of that described in murine CD4 +ve T cell clones by Mosmann and Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Traditionally, Th1-type responses are associated with the production of the INF- γ and IL-2 cytokines by T-lymphocytes. Other cytokines often directly associated with the induction of Th1-type immune responses are not produced by T-cells, such as IL-12. In contrast, Th2-type responses are associated with the secretion of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Suitable adjuvant systems which promote a predominantly Th1 response include Monophosphoryl lipid A or a derivative thereof, particularly 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) (for its preparation see GB 2220211 A), and a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A, together with either an aluminium salt (for instance aluminium phosphate or aluminium hydroxide) or an oil-in-water emulsion. In such combinations, antigen and 3D-MPL are contained in the same particulate structures, allowing for more efficient delivery of antigenic and immunostimulatory signals. Studies have shown that 3D-MPL is able to further enhance the immunogenicity of an alum-adsorbed antigen [Thoelen *et al* Vaccine (1998) 16:708-14, EP 689454-B1].

An enhanced system involves the combination of a monophosphoryl lipid A and a saponin derivative, particularly the combination of QS21 and 3D-MPL as disclosed in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol as disclosed in WO 96/33739.

A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil in water emulsion is described in WO 95/17210, and is a preferred formulation.

Preferably the vaccine additionally comprises a saponin, more preferably QS21. The formulation may also comprise an oil in water emulsion and tocopherol (WO 95/17210)

5 The present invention also provides a method for producing a vaccine formulation comprising mixing a protein of the present invention together with a pharmaceutically acceptable excipient, such as 3D-MPL.

Unmethylated CpG containing oligonucleotides (WO 96/02555) are also preferential inducers of a TH1 response and are suitable for use in the present invention.

10

Particularly preferred compositions of the invention comprise one or more conjugated pneumococcal polysaccharides, one or more pneumococcal proteins of the invention and a Th1 adjuvant. Without wishing to be bound by any theory, the induction of a cell mediated response by way of a pneumococcal protein (as described
15 above) and the cooperation between both arms of the immune system may be aided using such a Th-1 adjuvant, resulting in a particularly effective vaccine against pneumococcal disease in general, and, importantly, against pneumococcal pneumonia in the elderly

20 In a further aspect of the present invention there is provided an immunogen or vaccine as herein described for use in medicine.

In one embodiment there is a method of preventing or ameliorating pneumonia in an elderly human (+55 years) comprising administering a safe and effective amount of a vaccine, as described herein, comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and a pneumococcal protein selected from the group
25 consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a Th1 adjuvant, to said elderly patient.

In a further embodiment there is provided a method of preventing or ameliorating otitis media in Infants (up to 18 months) or toddlers (typically 18 months to 5 years), comprising administering a safe and effective amount of a vaccine
30 comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB,

PhaE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a Th1 adjuvant, to said Infant or toddler

Preferably in the methods of the invention as described above the polysaccharide antigen is present as a polysaccharide protein conjugate.

5

Vaccine Preparations of the Invention

The vaccine preparations of the present invention may be used to protect or treat a mammal susceptible to infection, by means of administering said vaccine via systemic or mucosal route. These administrations may include injection via the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes, or via mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory, genitourinary tracts. Intranasal administration of vaccines for the treatment of pneumonia or otitis media is preferred (as nasopharyngeal carriage of pneumococci can be more effectively prevented, thus attenuating infection at its earliest stage) Although the vaccine of the invention may be administered as a single dose, components thereof may also be co-administered together at the same time or at different times (for instance pneumococcal polysaccharides could be administered separately at the same time or 1-2 weeks after the administration of the bacterial protein component of the vaccine for optimal coordination of the immune responses with respect to each other) For co-administration, the optional Th1 adjuvant may be present in any or all of the different administrations, however it is preferred if it is present in combination with the bacterial protein component of the vaccine. In addition to a single route of administration, 2 different routes of administration may be used. For example, any viral antigens may be administered ID (intradermal), whilst bacterial proteins may be administered IM (intramuscular) or IN (intranasal). Polysaccharides may be administered IM (or ID) and bacterial proteins may be administered IN (or ID) In addition, the vaccines of the invention may be administered IM for priming doses and IN for booster doses

The amount of conjugate antigen in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccines Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. Generally, it is expected that each

dose will comprise 0.1-100 µg of polysaccharide, preferably 0.1-50 µg, preferably 0.1-10 µg, of which 1 to 5 µg is the most preferable range

The content of protein antigens in the vaccine will typically be in the range 1-100µg, preferably 5-50µg, most typically in the range 5 - 25µg

5 Optimal amounts of components for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects may receive one or several booster immunisations adequately spaced.

Vaccine preparation is generally described in Vaccine Design ("The subunit
10 and adjuvant approach" (eds Powell M F & Newman M.J) (1995) Plenum Press New York). Encapsulation within liposomes is described by Fullerton, US Patent 4,235,877

Although the vaccines of the present invention may be administered by any route, administration of the described vaccines into the skin (ID) forms one
15 embodiment of the present invention. Human skin comprises an outer "horny" cuticle, called the stratum corneum, which overlays the epidermis. Underneath this epidermis is a layer called the dermis, which in turn overlays the subcutaneous tissue. Researchers have shown that injection of a vaccine into the skin, and in particular the dermis, stimulates an immune response, which may also be associated with a number
20 of additional advantages. Intradermal vaccination with the vaccines described herein forms a preferred feature of the present invention.

The conventional technique of intradermal injection, the "mantoux procedure", comprises steps of cleaning the skin, and then stretching with one hand, and with the bevel of a narrow gauge needle (26-31 gauge) facing upwards the needle is inserted at
25 an angle of between 10-15°. Once the bevel of the needle is inserted, the barrel of the needle is lowered and further advanced whilst providing a slight pressure to elevate it under the skin. The liquid is then injected very slowly thereby forming a bleb or bump on the skin surface, followed by slow withdrawal of the needle.

More recently, devices that are specifically designed to administer liquid
30 agents into or across the skin have been described, for example the devices described in WO 99/34850 and EP 1092444, also the jet injection devices described for example in WO 01/13977, US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US

5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520, 639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 and WO 97/13537. Alternative methods of intradermal administration of the vaccine preparations may include conventional syringes and needles, or devices designed for ballistic delivery of solid vaccines (WO 99/27961), or transdermal patches (WO 97/48440; WO 98/28037), or applied to the surface of the skin (transdermal or transcutaneous delivery WO 98/20734, WO 98/28037).

When the vaccines of the present invention are to be administered to the skin, or more specifically into the dermis, the vaccine is in a low liquid volume, particularly a volume of between about 0.05 ml and 0.2 ml.

The content of antigens in the skin or intradermal vaccines of the present invention may be similar to conventional doses as found in intramuscular vaccines (see above). However, it is a feature of skin or intradermal vaccines that the formulations may be "low dose". Accordingly the protein antigens in "low dose" vaccines are preferably present in as little as 0.1 to 10 µg, preferably 0.1 to 5 µg per dose, and the polysaccharide (preferably conjugated) antigens may be present in the range of 0.01-1 µg, and preferably between 0.01 to 0.5 µg of polysaccharide per dose.

As used herein, the term "intradermal delivery" means delivery of the vaccine to the region of the dermis in the skin. However, the vaccine will not necessarily be located exclusively in the dermis. The dermis is the layer in the skin located between about 1.0 and about 2.0 mm from the surface in human skin, but there is a certain amount of variation between individuals and in different parts of the body. In general, it can be expected to reach the dermis by going 1.5 mm below the surface of the skin. The dermis is located between the stratum corneum and the epidermis at the surface and the subcutaneous layer below. Depending on the mode of delivery, the vaccine may ultimately be located solely or primarily within the dermis, or it may ultimately be distributed within the epidermis and the dermis.

The present invention also contemplates combination vaccines which provide protection against a range of different pathogens. Many Paediatric vaccines are now given as a combination vaccine so as to reduce the number of injections a child has to

receive. Thus for Paediatric vaccines other antigens from other pathogens may be formulated with the vaccines of the invention. For example the vaccines of the invention can be formulated with (or administered separately but at the same time) the well known 'trivalent' combination vaccine comprising Diphtheria toxoid (DT), tetanus toxoid (TT), and pertussis components [typically detoxified Pertussis toxoid (PT) and filamentous haemagglutinin (FHA) with optional pertactin (PRN) and/or agglutinin 1+2], for example the marketed vaccine INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biologicals) which contains DT, TT, PT, FHA and PRN antigens, or with a whole cell pertussis component for example as marketed by SmithKlineBeecham Biologicals s.a., as Tritanrix™. The combined vaccine may also comprise other antigen, such as Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Polio virus antigens (for instance inactivated trivalent polio virus – IPV), *Moraxella catarrhalis* outer membrane proteins, non-typeable *Haemophilus influenzae* proteins, *N meningitidis* B outer membrane proteins.

Examples of preferred *Moraxella catarrhalis* protein antigens which can be included in a combination vaccine (especially for the prevention of otitis media) are OMP106 [WO 97/41731 (Antax) & WO 96/34960 (PMC)], OMP21, LbpA &/or LbpB [WO 98/55606 (PMC)], TbpA &/or TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)], CopB [Helminen ME, *et al* (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010], UspA1 and/or UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)], OmpCD, HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977 2), lipo10 (GB 9918208 1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), D15 (PCT/EP99/03822), OmpLA1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), and OmpE. Examples of non-typeable *Haemophilus influenzae* antigens which can be included in a combination vaccine (especially for the prevention of otitis media) include. Fimbria protein [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] and fusions comprising peptides therefrom [eg LB1(f) peptide fusions; US 5843464 (OSU) or WO 99/64067], OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)], P6 [EP 281673 (State University of New York)], TbpA and/or TbpB, Hia, Hsf, Hin47, Huf, Hmw1, Hmw2, Hmw3, Hmw4, Hap, D15 (WO 94/12641), protein D (EP 594610), P2, and P5 (WO 94/26304).

Other combinations contemplated are the pneumococcal PS & protein of the invention in combination with viral antigens, for example, from influenza (attenuated, split, or subunit [e.g., surface glycoproteins neuraminidase (NA) and haemagglutinin (HA) See, e.g., Chaloupka L et al, Eur Journal Clin. Microbiol Infect Dis 1996, 5 15 121-127], RSV (e.g., F and G antigens or F/G fusions, see, eg, Schmidt A C et al, J Virol, May 2001, p4594 - 4603), PIV3 (e.g., HN and F proteins, see Schmidt et al supra), Varicella (e.g., attenuated, glycoproteins I-V, etc.), and any (or all) component(s) of MMR (measles, mumps, rubella)

A preferred Paediatric combination vaccine contemplated by the present invention for global treatment or prevention of otitis media comprises. one or more 10 *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen(s) (preferably conjugated to protein D), one or more pneumococcal proteins selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 (or an immunologically functional equivalent thereof), and one or more surface- 15 exposed antigen from *Moraxella catarrhalis* and/or non-typeable *Haemophilus influenzae*. Protein D can advantageously be used as a protein carrier for the pneumococcal polysaccharides to overcome epitope suppression problems (as mentioned above), and because it is in itself an immunogen capable of producing B-cell mediated protection against non-typeable *H. influenzae* (ntHi). The *Moraxella* 20 *catarrhalis* or non-typeable *Haemophilus influenzae* antigens can be included in the vaccine in a sub-unit form, or may be added as antigens present on the surface of outer membrane vesicles (blebs) made from the bacteria.

Preferably the antigenic compositions (and vaccines) hereinbefore described 25 are lyophilised up until they are about to be used, at which point they are extemporaneously reconstituted with diluent. More preferably they are lyophilised in the presence of 3D-MPL, and are extemporaneously reconstituted with saline solution. Alternatively, the protein and polysaccharide may be stored separately in a vaccination kit (either or both components being lyophilised), the components being 30 reconstituted and either mixed prior to use or administered separately to the patient. A Th1 adjuvant (preferably 3D-MPL) may be present with either or both of the components.

The lyophilisation of vaccines is well known in the art. Typically the liquid vaccine is freeze dried in the presence of an anti-caking agent for instance sugars such as sucrose or lactose (present at an initial concentration of 10-200 mg/mL). Lyophilisation typically occurs over a series of steps, for instance a cycle starting at –
5 69 °C, gradually adjusting to –24 °C over 3 hours, then retaining this temperature for 18 hours, then gradually adjusting to –16 °C over 1 hour, then retaining this temperature for 6 hours, then gradually adjusting to +34 °C over 3 hours, and finally retaining this temperature over 9 hours.

Lyophilising the compositions results in a more stable composition (for
10 instance it prevents the breakdown of the polysaccharide antigens). The process is also surprisingly responsible for a higher antibody titre against the pneumococcal polysaccharides. This has been shown to be particularly significant for PS 6B conjugates. Another aspect of the invention is thus a lyophilised antigenic
15 composition comprising a PS 6B conjugate adjuvanted with 3D-MPL (preferably devoid of aluminium-based adjuvants) and a pneumococcal protein selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133.

20 EXAMPLES

The examples illustrate, but do not limit the invention.

Example 1

S.pneumoniae capsular polysaccharide

25 The 11-valent candidate vaccine includes the capsular polysaccharides serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F which were made essentially as described in EP 72513. Each polysaccharide is activated and derivatised using CDAP chemistry (WO 95/08348) and conjugated to the protein carrier. All the polysaccharides are conjugated in their native form, except for the serotype 3 (which
30 was size-reduced to decrease its viscosity).

Protein carrier

The protein carrier selected is the recombinant protein D (PD) from Non typeable *Haemophilus influenzae*, expressed in *E. coli*.

EXPRESSION OF PROTEIN D

5 *Haemophilus influenzae* protein D

Genetic construction for protein D expression

Starting materials

The Protein D encoding DNA

Protein D is highly conserved among *H. influenzae* of all serotypes and non-
10 typeable strains. The vector pHIC348 containing the DNA sequence encoding the entire protein D gene has been obtained from Dr A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Sweden. The DNA sequence of protein D has been published by Janson et al. (1991) Infect. Immun. 59 119-125

15

The expression vector pMG1

The expression vector pMG1 is a derivative of pBR322 (Gross *et al* , 1985) in which bacteriophage λ derived control elements for transcription and translation of foreign inserted genes were introduced (Shatzman *et al* , 1983). In addition, the
20 Ampicillin resistance gene was exchanged with the Kanamycin resistance gene.

The E. coli strain AR58

The *E. coli* strain AR58 was generated by transduction of N99 with a P1 phage stock previously grown on an SA500 derivative (galE⁻ TN10, lambdaK11 cI857 Δ H1)
25 N99 and SA500 are *E. coli* K12 strains derived from Dr Martin Rosenberg's laboratory at the National Institute of Health.

The expression vector pMG 1

For the production of protein D, the DNA encoding the protein has been
30 cloned into the expression vector pMG 1. This plasmid utilises signals from lambda phage DNA to drive the transcription and translation of inserted foreign genes. The vector contains the promoter PL, operator OL and two utilisation sites (NutL and

NutR) to relieve transcriptional polarity effects when N protein is provided (Gross *et al.*, 1985) Vectors containing the PL promoter, are introduced into an *E. coli* lysogenic host to stabilise the plasmid DNA. Lysogenic host strains contain replication-defective lambdaphage DNA integrated into the genome (Shatzman *et al.*, 5 1983) The chromosomal lambdaphage DNA directs the synthesis of the cI repressor protein which binds to the OL repressor of the vector and prevents binding of RNA polymerase to the PL promoter and thereby transcription of the inserted gene The cI gene of the expression strain AR58 contains a temperature sensitive mutant so that PL directed transcription can be regulated by temperature shift, i.e. an increase in culture 10 temperature inactivates the repressor and synthesis of the foreign protein is initiated. This expression system allows controlled synthesis of foreign proteins especially of those that may be toxic to the cell (Shimatake & Rosenberg, 1981)

The E. coli strain AR58

15 The AR58 lysogenic *E. coli* strain used for the production of the protein D carrier is a derivative of the standard NIH *E. coli* K12 strain N99 (F⁻ su galK2, lacZ⁻ thr⁻) It contains a defective lysogenic lambdaphage (galE TN10, lambdaKil cI857 ΔH1). The Kil⁻ phenotype prevents the shut off of host macromolecular synthesis The cI857 mutation confers a temperature sensitive lesion to the cI repressor The ΔH1 20 deletion removes the lambdaphage right operon and the hosts bio, uvr3, and chlA loci. The AR58 strain was generated by transduction of N99 with a P1 phage stock previously grown on an SA500 derivative (galE⁻ TN10, lambdaKil⁻ cI857 ΔH1) The introduction of the defective lysogen into N99 was selected with tetracycline by virtue of the presence of a TN10 transposon coding for tetracycline resistance in the adjacent 25 galE gene.

Construction of vector pMGMDPPrD

The pMG 1 vector which contains the gene encoding the non-structural S1 protein of Influenzae virus (pMGNS1) was used to construct pMGMDPPrD The 30 protein D gene was amplified by PCR from the pHIC348 vector (Janson *et al.* 1991) with PCR primers containing NcoI and XbaI restriction sites at the 5' and 3' ends, respectively The NcoI/XbaI fragment was then introduced into pMGNS1 between

NcoI and XbaI thus creating a fusion protein containing the N-terminal 81 amino acids of the NS1 protein followed by the PD protein. This vector was labeled pMGNS1PrD

Based on the construct described above the final construct for protein D expression was generated. A BamHI/BamHI fragment was removed from pMGNS1PrD. This DNA hydrolysis removes the NS1 coding region, except for the first three N-terminal residues. Upon religation of the vector a gene encoding a fusion protein with the following N-terminal amino acid sequence has been generated

10 —MDP SSHSSNMANT—
NS1 Protein D

The protein D does not contain a leader peptide or the N-terminal cysteine to which lipid chains are normally attached. The protein is therefore neither excreted into the periplasm nor lipidated and remains in the cytoplasm in a soluble form.

The final construct pMG-MDPPrD was introduced into the AR58 host strain by heat shock at 37 °C. Plasmid containing bacteria were selected in the presence of Kanamycin. Presence of the protein D encoding DNA insert was demonstrated by digestion of isolated plasmid DNA with selected endonucleases. The recombinant *E. coli* strain is referred to as ECD4.

Expression of protein D is under the control of the lambda P_L promoter/ O_L Operator. The host strain AR58 contains a temperature-sensitive cI gene in the genome which blocks expression from lambda P_L at low temperature by binding to O_L. Once the temperature is elevated cI is released from O_L and protein D is expressed. At the end of the fermentation the cells are concentrated and frozen.

The extraction from harvested cells and the purification of protein D was performed as follows. The frozen cell culture pellet is thawed and resuspended in a cell disruption solution (Citrate buffer pH 6.0) to a final OD₆₀₀ = 60. The suspension is passed twice through a high pressure homogenizer at P = 1000 bar. The cell culture homogenate is clarified by centrifugation and cell debris are removed by filtration. In the first purification step the filtered lysate is applied to a cation exchange chromatography column (SP Sepharose Fast Flow). PD binds to the gel matrix by

ionic interaction and is eluted by a step increase of the ionic strength of the elution buffer

In a second purification step impurities are retained on an anionic exchange matrix (Q Sepharose Fast Flow) PD does not bind onto the gel and can be collected in the flow through.

In both column chromatography steps fraction collection is monitored by OD The flow through of the anionic exchange column chromatography containing the purified protein D is concentrated by ultrafiltration.

The protein D containing ultrafiltration retentate is finally passed through a 0.2 μ m membrane

Chemistry

Activation and coupling chemistry

The activation and coupling conditions are specific for each polysaccharide These are given in Table 1 Native polysaccharide (except for PS3) was dissolved in NaCl 2M or in water for injection. The optimal polysaccharide concentration was evaluated for all the serotypes

From a 100 mg/ml stock solution in acetonitrile, CDAP (CDAP/PS ratio 0.75 mg/mg PS) was added to the polysaccharide solution. 15 minutes later, 0.2M triethylamine was added to obtain the specific activation pH. The activation of the polysaccharide was performed at this pH during 2 minutes at 25 °C. Protein D (the quantity depends on the initial PS/PD ratio) was added to the activated polysaccharide and the coupling reaction was performed at the specific pH for 1 hour The reaction was then quenched with glycine for 30 minutes at 25 °C and overnight at 4 °C

The conjugates were purified by gel filtration using a Sephacryl 500HR gel filtration column equilibrated with 0.2M NaCl.

The carbohydrate and protein content of the eluted fractions was determined. The conjugates were pooled and sterile filtered on a 0.22 μ m sterilizing membrane The PS/Protein ratios in the conjugate preparations were determined.

30

Characterisation.

Each conjugate was characterised and met the specifications described in Table 2. The polysaccharide content ($\mu\text{g/ml}$) was measured by the Resorcinol test and the protein content ($\mu\text{g/ml}$) by the Lowry test. The final PS/PD ratio (w/w) is determined by the ratio of the concentrations

5

Residual DMAP content (ng/ μg PS)

The activation of the polysaccharide with CDAP introduces a cyanate group in the polysaccharide and DMAP (4-dimethylamino-pyridin) is liberated. The residual DMAP content was determined by a specific assay developed at SB

10

Free polysaccharide content (%)

The free polysaccharide content of conjugates kept at 4°C or stored 7 days at 37°C was determined on the supernatant obtained after incubation with α -PD antibodies and saturated ammonium sulfate, followed by a centrifugation.

15

An α -PS/ α -PS ELISA was used for the quantification of free polysaccharide in the supernatant. The absence of conjugate was also controlled by an α -PD/ α -PS ELISA. Reducing the quantity of free polysaccharide results in an improved conjugate vaccine

20 ***Antigenicity***

The antigenicity on the same conjugates was analyzed in a sandwich-type ELISA wherein the capture and the detection of antibodies were α -PS and α -PD respectively

25 ***Free protein content (%)***

The level of "free" residual protein D was determined by using a method with SDS treatment of the sample. The conjugate was heated 10 min at 100°C in presence of SDS 0.1 % and injected on a SEC-HPLC gel filtration column (TSK 3000-PWXL). As protein D is dimer, there is a risk of overestimating the level of

30 "free" protein D by dissociation the structure with SDS

Molecular size (K_m)

The molecular size was performed on a SEC-HPLC gel filtration column (TSK 5000-PWXL)

Stability

5 The stability was measured on a HPLC-SEC gel filtration (TSK 6000-PWXL) for conjugates kept at 4°C and stored for 7 days at 37°C

The 11-valent characterization is given in Table 2

The protein conjugates can be adsorbed onto aluminium phosphate and pooled to form the final vaccine

10

Conclusion

Immunogenic conjugates have been produced, that have since been shown to be components of a promising vaccine. The optimised CDAP conditions for the best quality final conjugated pneumococcal polysaccharide product was discovered for

15 each of the 11 valencies

Table 1
Specific activation/coupling/quenching conditions of PS *S.pneumoniae*-Protein D
conjugates

Serotype	1	3 (μ fold.)	4	5	6B	7F
PS conc.(mg/ml)	20	30	20	75	54	30
PS dissolution	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD conc.(mg/ml)	50	50	50	50	50	50
Initial PS/PD Ratio (w/w)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP conc. (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _i =pH _c =pH _f	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

5

Serotype	9V	14	18C	19F	23F
PS conc.(mg/ml)	25	25	20	40	33
PS dissolution	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD conc.(mg/ml)	50	50	50	50	50
Initial PS/PD Ratio (w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1	1/0.5	1/1
CDAP conc. (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _i =pH _c =pH _f	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	10/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

TABLE 2 Specifications of the 11 valent pneumococcal PS-PD vaccine (first numbers of the batch code indicates serotype)

Criteria	D01PDJ227	D03PDJ236	D4PDJ228	D5PDJ235	D6PDJ209	
Ratio PS/Prot (w/w)	1/0.66	1/1.09	1/0.86	1/0.86	1/0.69	
Free polysac. content (%)	1	1	7	9	0	
<10 %						
Free protein content (%)	8	<1	19	21	9	
<15 %						
DMAF content (ng/µg PS)	0.2	0.6	0.4	1.2	0.3	
<0.5 ng/µg PS						
Molecular size (K _{av})	0.18	0.13	0.12	0.11	0.13	
Stability	no shift	no shift	no shift	low shift	no shift	
	D07PDJ225	D09PDJ222	D14PDJ202	D18PDJ221	D19PDJ206	D23PDJ212
Ratio PS/Prot (w/w)	1/0.58	1/0.80	1/0.68	1/0.62	1/0.45	1/0.74
Free polysac. content (%)	1	<1	<1	4	4	0
<10 %						
Free protein content (%)	8	0.3	3	21	10	12
<15 %						
DMAF content (ng/µg PS)	0.1	0.6	0.3	0.2	0.1	0.9
<0.5 ng/µg PS						
Molecular size (K _{av})	0.14	0.14	0.17	0.10	0.12	0.12
Stability	no shift	no shift	no shift	no shift	shift	no shift

Example 2 - Beneficial impact of the addition of one or more of the pneumococcal proteins of the invention +/- 3D-MPL on the protective effectiveness of PD-conjugated 11-valent polysaccharide vaccine against pneumococcal lung colonization in mice

Immunological read-outs

ELISA dosage of pneumococcal protein-specific serum IgG

Maxisorp Nunc immunoplates are coated for 2 hours at 37°C with 100 µl/well of 2 µg/ml protein diluted in PBS. Plates are washed 3 times with NaCl 0.9% Tween-20 0.05% buffer. Then, serial 2-fold dilutions (in PBS/ Tween-20 0.05%, 100 µl per well) of an anti-protein serum reference added as a standard curve (starting at 670 ng/ml IgG) and serum samples (starting at a 1/10 dilution) are incubated for 30 minutes at 20°C under agitation. After washing as previously described, peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson) diluted 5000x in PBS/ Tween-20 0.05% are incubated (100 µl/well) for 30 minutes at 20°C under agitation. After washing, plates are incubated for 15 min at room temperature with 100 µl/well of revelation buffer (OPDA 0.4 mg/ml and H₂O₂ 0.05% in 100mM pH 4.5 citrate buffer). Revelation is stopped by adding 50 µl/well HCl 1N. Optical densities are read at 490 and 620 nm by using Emax immunoreader (Molecular Devices). Antibody titre is calculated by the 4 parameter mathematical method using SoftMaxPro software.

Opsonophagocytosis assay

The purpose of this assay is to reproducibly measure the opsonising capacity of test serum samples against *Streptococcus pneumoniae* serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F or 23F using a method adapted from the published standardized method of the CDC (Steiner et al, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 4:415 1997).

This assay reproduces *in vitro* what occurs *in vivo* as the primary mechanism of eliminating invading *Streptococcus pneumoniae* or pneumococci. That is opsonization of the pneumococci followed by phagocytosis and then killing. "Phagocytosis" is the process by which cells engulf material and enclose it within a vacuole (phagosome) in the cytoplasm. Pneumococci are killed when they are

phagocytosed by healthy mammalian phagocytes "Opsonization" is the process by which phagocytosis is facilitated by the deposition of opsonins, e.g. antibody and complement, on the antigen.

There have been numerous opsonophagocytic assays reported in the literature

5 The standardized method of the CDC was tested in a multi-lab setting (Steiner et al, ICAAC, Sept 16- 20, 2000, Toronto) This latter assay was adapted at SB since it provided a basis for comparison to other laboratories, it used reagents and controls that are generally available, and it expressed the results as the titre (dilution) of serum able to facilitate killing of 50% of viable pneumococci, a unit that is commonly used

10 for this type of assay Indeed, it was shown that the adapted assay could generate results that corresponded quite well with 4 other laboratories (Steiner et al, ICAAC, Sept 16- 20, 2000, Toronto)

The phagocytic cell used in the assay is the HL60 cell line, which originated from an individual with promyelocytic leukemia and was established as a continuous

15 cell line by Collins et al in 1977 (Nature 270 347-9) This cell line is composed of undifferentiated hematopoietic cells, that is 85% blast cells and promyelocytes, 6% myelocytes and 9% differentiated cells. Polar compounds can induce the differentiation of the cells into at least two different lineages. N,N-dimethylformamide induces granulocytic differentiation which yield polymorphonuclear-like cells (44%

20 myelocytes and metamyelocytes and 53% banded and segmented PMNs).

In Version A2 of the assay, the sera to be tested are heat-inactivated and 8 two-fold serial dilutions starting at 1/4 are made in 96-well microplates in HBSS medium containing 0.3% BSA. The final volume of diluted serum in each well is 25µl.

25 Four volumes of HL60 cells at 10^7 cells /ml (5 or 6 days post differentiation with Dimethyl formamide), 2 volumes of *S.pneumoniae* bacteria (at the appropriate dilution) and 1 volume of baby rabbit complement are mixed just prior to use, and 25 µl of the mixture is added to each well of the 96-well microplate containing the diluted sera. For serotypes 1, and 6B, the amount of complement is increased to

30 12.5% final concentration, giving Version A3 of the assay

After two hours incubation at 37°C under orbital shaking, the plate is put on ice in order to stop the opsonophagocytosis reaction.

23

An estimate is made of the the colony forming units (CFU) in each well by overnight incubation at 37°C. The "opsonic titre" (OT) is defined as the reciprocal dilution of the serum able to reduce by at least 50% the number of *S. pneumoniae* bacteria in the wells (ie, 50 % killing). The % killing is calculated by the following formulae

5

$$\% \text{ killing} = (\text{Mean CFU control wells} - \text{CFU sample}) / \text{Mean CFU control wells} \times 100$$

Pneumococcal intranasal challenge in OF1 mice

Seven week-old OF1 female mice are intranasally inoculated under anaesthesia with 5×10^3 CFU of mouse-adapted *S. pneumoniae* serotype 2, 4 or 6B. Lungs are removed at 6 hours after challenge and homogenized (Ultramax, 24000 rpm, 4°C) in Todd Hewith Broth (THB, Gibco) medium. Serial 10-fold dilutions of lung homogenates are plated overnight at 37°C onto Petri dishes containing yeast extract-supplemented THB agar. Pneumococcal lung infection is determined as the number of CFU/mouse, expressed as logarithmic weighted-average. Detection limit is $2.14 \log$ CFU/mouse.

15

Example 2A 3D-MPL adjuvant effect on anti-protein immune response

In the present example, we can evaluate the impact of 3D-MPL adjuvantation on the immune response to the protein of the invention.

20

Groups of 10 female 6 week-old Balb/c mice are intramuscularly immunized at days 0, 14 and 21 with 1 µg protein contained in either A. AlPO₄ 100 µg, or B. AlPO₄ 100 µg + 5 µg 3D-MPL (3 de-O-acylated monophosphoryl lipid A, supplied by Ribi Immunochem). ELISA IgG is measured in post-III sera.

25

Whichever the antigen, best immune responses can be shown to be induced in animals vaccinated with 3D-MPL-supplemented formulations.

Example 2B Beneficial impact of the addition of a protein of the invention +/- 3D-MPL adjuvant on the protective effectiveness of PD-conjugated 11-valent polysaccharide vaccine against pneumococcal lung colonization in OF1 mice intranasally challenged with serotype 2, 4 or 6B.

30

In the present example, we can evaluate the prophylactic efficacy of a vaccine containing the 11-valent polysaccharide-protein D conjugate, a protein of the invention and AlPO₄ + 3D-MPL adjuvants, compared to the classical AlPO₄-adsorbed 11-valent polysaccharide-protein D conjugate formulation.

- 5 Groups of 12 female 4 week-old OF1 mice are immunized subcutaneously at days 0 and 14 with formulations containing A. 50 µg AlPO₄, B 0.1 µg PS/serotype of PD-conjugated 11-valent polysaccharide vaccine + 50 µg AlPO₄, or C 0.1 µg PS/serotype of PD-conjugated 11-valent polysaccharide vaccine + 10 µg protein of the invention + 50 µg AlPO₄ + 5 µg 3D-MPL (supplied by Ribi Immunochem).
- 10 Challenge is done at day 21 as described above.

- As can be shown by this method, a significant protection is conferred by the 11-valent polysaccharide conjugate vaccine supplemented with the protein of the invention and adjuvanted with AlPO₄ + MPL. On the contrary, no significant protection is observed in animals immunized with the 11-valent polysaccharide conjugate / AlPO₄ formulation. This result can prove that the addition of the protein of the invention and 3D-MPL adjuvant enhances the effectiveness of the 11-valent polysaccharide conjugate vaccine against pneumonia.
- 15

Example 2C, immune correlates of the protection showed in example 2B

- 20 In order to establish the immune correlates of protection conferred in example 2B, by the 11-valent polysaccharide conjugate vaccine supplemented with a protein of the invention and 3D-MPL, pre-challenge serological antibody responses to polysaccharide 2, 4 or 6B, and the protein of the invention can be measured as described above

- 25 Antibody titers are then compared to bacteria colony numbers measured in lungs of the corresponding animals collected at 6 hours post-challenge. R^2 are calculated on Log/Log linear regressions.

- Calculated R^2 can show the absence of correlation between humoral immune responses and protection for both antigens. Anti-6B (or 2 or 4) antibody titers are not significantly different in the groups immunized with the 11-valent conjugate vaccine or with the same vaccine supplemented with the protein of the invention and 3D-
- 30

MPL Therefore, the protection improvement seen with formulation C is not solely due to a higher antibody response to polysaccharide 6B (or 2 or 4)

Taken together, the results can suggest that protection is not mediated by humoral immune responses alone, but rather also by a cell-mediated immunity induced by the protein antigen (preferably in the presence of 3D-MPL) This can give additional support to the addition of protein antigen(s) and potent adjuvant(s) in the pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine, so as to coordinate both arms of the immune system for optimal protection.

10 **Example 3 – The Cooperation of both arms of the Immune System in mice actively immunised with a protein of the invention and passively immunised with antibodies against pneumococcal PS**

15 **Example 3A - Find the Concentration of Passively Administered Anti-6B-Polysaccharide (anti-PS) Antibody Protecting Against Pneumonia**

Method

Vaccine Groups Four groups of 16 mice were passively immunised (i.p.) on day -1 with 100 µl of undiluted rat anti-polysaccharide antisera according to the groups detailed below (total 64 mice)

Group	Specificity	IgG Concentration in Antisera
G1	α-PS -6B	5 µg/ml
G2	α-PS -6B	2 µg/ml.
G3	α-PS -6B	0.75 µg/ml
G4	Control	0 µg/ml

Animals 64 male CD-1 mice from Charles River, Canada, weighing approx 35g (approx 10 weeks old)

25 **Anesthesia.** Mice were anesthetized with isoflurane (3%) plus O₂(1 L/min)

Organism *S. pneumoniae* N1387 (serotype 6) was harvested from trypticase soy agar plates (TSA) supplemented with 5% horse blood and suspended in 6 ml of PBS Immediately prior to infection, 1 ml bacterial suspension was diluted into 9 ml

of cooled molten nutrient agar (BBL) and kept at 41°C Mice received approx 6 0 log10 cfu/mouse in a volume 50 ul

Infection. On day 0 mice were anesthetized as described above and infected with *S. pneumonias* N1387 (50 µl cooled bacterial suspension) by intra-bronchial instillation via non-surgical intra-tracheal intubation. This method was described by Woodnut and Berry (Antimicrob Ag Chemotherap 43 29 (1999))

Samples On day 3 post infection, 8 mice/group were sacrificed by CO2 overdose and lungs were excised and homogenized in 1 ml PBS Tenfold serial dilutions were prepared in PBS to enumerate viable bacterial numbers Samples were inoculated (20 µl) in triplicate onto TSA plates supplemented with 5% horse blood and incubated overnight at 37 °C prior to evaluation. Further sets of mice were sacrificed on day 7 and sampled as above

Results

IgG conc (ug/ml) in rat sera	Bacterial numbers (log 10 cfu/lungs) at days post infection	
	3	8
5	6.7 ± 0.7 (1/7)	7.2 ± 0.7 (5/8)
2	6.5 ± 0.7 (1/7)	6.9 ± 1.8 (4/7)
0.75	7.7 ± 0.5 (5/8)	4.8 ± 1.4 (2/8)
0	6.7 ± 1.5 (3/6)	6.3 ± 1.5 (3/9)

Figures in parentheses are numbers of animals that died prior to sample time.

Conclusion In general, there was no significant difference in bacterial numbers isolated from any of the treatment groups. This indicates that no measurable protection was afforded by the anti-polysaccharide antibody at concentrations up to and including 5 µg/ml

This is similar to what is observed in some human clinical trials, that is, anti-polysaccharide antibody is insufficient to protect against pneumococcal pneumonia in some populations

Example 3B - Determine the protection from pneumonia afforded by active administration of a protein of the invention with or without adjuvant, and synergy with sub-optimal anti-PS antibody

25

Method

Animals 128 male CD-1 mice (6 weeks old at old at immunisation, 10 weeks old at infection) from Charles River, St. Constant, Quebec, Canada. Animals weighed approx 20 gm at 6 weeks and 38g at 10 weeks

Immunisations Six groups of 16 mice are immunised by subcutaneous injection on days -22 and -14 with 100 ul of vaccine as detailed below (Total 128 mice) 3D-MPL is obtained from Ribi/Corixa.

On day -1, specific groups (see Table below) are immunised (i p 100 µl) passively with a concentration of 4 26 µg/ml (4 ml of 5 µg/ml + 1.3 ml of 2 µg/ml) mouse anti-polysaccharide antibody

Group	Injection Volume Active	Vaccine given days -22, -14 (Dosage µg)	Injection Volume Passive	Passive IgG (day-1)
1-1	100 µl s c	Protein/AIPO4 (10/50)		None
1-2	100 µl s.c.	Protein/MPL/AIPO4 (10/5/50)		None
1-3	100 µl s.c	Protein/AIPO4 (10/50)	100 µl l.p.	α-PS
1-4	100 µl s.c	Protein/MPL/AIPO4 (10/5/50)	100 µl l.p.	α-PS
1-5	100 µl s.c.	MPL/AIPO4 (5/50)	100 µl i p.	α-PS
1-6	100 µl s.c.	MPL/AIPO4 (5/50)		None

Infection. On day 0, mice are anesthetized (3% isoflurane plus 1 L/min O₂) Bacterial inocula are prepared by harvesting growth of *S. pneumoniae* N1387 (serotype 6) from trypticase soy agar plates (TSA) supplemented with 5% horse blood and suspending in 6 ml of PBS A ten-fold dilution (1ml plus 9ml) is prepared in cooled molten nutrient agar (kept at 41 °C) immediately prior to infection. Mice are infected by intra-bronchial instillation via intra-tracheal intubation and receive approximately 6 0 log₁₀ cfu/mouse in a volume of 50 µl. This method was described by Woodnut and Berry (Antimicrob Ag. Chemotherap 43 29 (1999))

Samples At 72 post infection, 8 mice/group are sacrificed by CO₂ overdose and the lungs are excised and homogenized in 1 ml PBS Tenfold serial dilutions are prepared in PBS to enumerate viable bacterial numbers Samples are inoculated (20 µl) in triplicate onto TSA plates supplemented with 5% horse blood and incubated

overnight 37 °C prior to evaluation. Further sets of mice are sacrificed on day 8 post-infection and samples as above.

Analysis of Data

- 5 The outcome measure for comparison of treatment is the number of bacteria in the lungs at 3 and 7 day post infection. Results can be presented as group means with standard deviations. Statistical analysis should be performed using the Students t-test where a P value of <0.05 is considered significant.

- 10 As demonstrated above, anti-polysaccharide antibody alone (Group 1-5) can be shown not to afford protection against growth of pneumococci in the lung. Pneumococcal protein adjuvanted with AlPO₄ (Group 1-1) may not confer protection either, but will do to a better extent when Protein is combined with 3D-MPL (Group 1-2).

- 15 Most significant protection can be seen in groups with both anti-polysaccharide antibody and protein, particularly in the group having all three elements, Protein, 3D-MPL and passively administered anti-polysaccharide antibody (Group 1-4). This conclusion can also be supported by the mortality rate. Groups 1-3 and, particularly, 1-4 will have fewer deaths compared to the other groups.

20 Conclusion.

 As the experiment is done with passively immunised animals, the synergistic effect of also actively immunising with protein (+/- MPL) cannot be due to an increase in the level of antibodies against the polysaccharide antigen.

- 25 Significant protection against pneumococcal pneumonia can be seen in groups immunised with both protein plus passively administered anti-polysaccharide antibody, particularly if 3D-MPL is also present, indicating the synergy of this combination.

- 30 If the anti-polysaccharide immunisation is carried out actively (preferably with conjugated polysaccharide), this effect will be even more marked, as the effect of B-cell memory, and constant levels of anti-PS antibody throughout the experiment will contribute to the immune response cooperation.

Example 4 - Method to determine synergy by correlate of protection

The principle mechanism of protection that the human body uses to eliminate infecting pneumococcus is antibody mediated opsonophagocytosis (Bruyn et al Clin. Infect. Dis. 14 251 (1992)). Whereas several ELISA methods have been developed to measure the antibody concentration to capsular polysaccharide as a correlate of protection, it has become apparent that the *in vitro* opsonophagocytosis assay is a better correlate of protection (Musher et al J Infect. Dis 182 158 (2000))

The Pneumococcal proteins of the invention provide protection against pneumococcal infection by mechanisms that are different from antibody mediated opsonophagocytosis. In example 2, active immunisation with both conjugate and protein can show a synergic effect, which can not be explained by the antibody concentration differences since they are the same in both groups. Thus the residual protection that can be observed must come from a synergistic effect. Similarly, since the antibody is added passively, the same conclusion can be reached in example 3

In many cases, the pneumococcal proteins of the invention are surface associated, and are expected to provide some opsonic activity themselves. In this case it is possible to distinguish the mechanism of protection via a quantitative measure of the opsonising capacity of the anti-pneumococcal protein, which can be used to estimate the relative contribution of opsonic activity to other synergistic mechanisms of protection.

In the mouse lung colonisation model, the relative protection of each vaccine can be estimated from the clearance of bacteria from the lungs. Or alternatively, the vaccine efficacy can be estimated from case rates, as normally determined for vaccines.

$$\% \text{ Protection} = (\text{CFU/lung Control} - \text{CFU/lung Vaccine}) / (\text{CFU/lung Control})$$

$$\% \text{ Efficacy} = (\text{Cases Control} - \text{Cases Vaccine}) / (\text{Cases Control})$$

To determine the portion of the protection or efficacy that originates from the synergistic effect, it is a matter of determining which portion of the efficacy would be expected based on the ratio of the opsonic titres

In Example 3 above, the % protection by the combination is due to synergy between the protein/antibody components as neither the protein nor the anti-polysaccharide antibody alone can provide much protection themselves

5 It is possible to estimate the amount of protection of the synergistic effect on the basis of the relative opsonic activity. If the opsonic activity afforded by an anti-capsular polysaccharide antibody is X, and the opsonic activity afforded by anti-pneumococcal protein antibody is Y, then the total opsonic activity can be shown to be $X + Y$, and the relative portion of the opsonic activity of the protein would be $Y/X+Y$. This is compared to the relative protective efficacy of a vaccine, where the
10 anti-polysaccharide portion of the vaccine provides a protective efficacy of A%, and the protective efficacy of the vaccine of polysaccharide plus protein is B%. The additional efficacy that can not be accounted by opsonic activity is then estimated as
Residual Protective Activity (Synergy) = $B\% - A\% - B\% * (Y/X+Y)$

15 This example is not intended to limit the ways to estimate the effect of synergy. Once other correlates of protection have been identified, they could be used to estimate this synergistic effect.

All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual
20 publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

A

Claims

- 1 An immunogenic composition comprising at least one *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA,
5 LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, or immunologically functional equivalent thereof.
- 2 The immunogenic composition of claim 1, wherein the polysaccharide antigen is presented in the form of a polysaccharide-protein carrier conjugate
10
- 3 The immunogenic composition of claim 2, wherein the carrier protein is selected from the group consisting of Diphtheria toxoid, Tetanus toxoid, CRM197, Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), protein derivative of Tuberculin (PPD), and protein D from *H influenzae*
15
- 4 An immunogenic composition as claimed in any of claims 1 to 3 wherein the vaccine comprises at least four pneumococcal polysaccharide antigens from different serotypes.
- 20 5 An immunogenic composition as claimed herein additionally comprising an adjuvant.
- 6 An immunogenic composition as claimed in claim 5, wherein the adjuvant comprises an aluminum salt.
25
- 7 An immunogenic composition as claimed in claim 5, wherein the adjuvant is a preferential inducer of a TH1 response
- 8 An immunogenic composition as claimed in claim 7, wherein the adjuvant
30 comprises at least one of the following 3D-MPL, a saponin immunostimulant, or an immunostimulatory CpG oligonucleotide

- 9 An immunogenic composition as claimed in claim 8, wherein the adjuvant comprises a carrier selected from the group comprising an oil in water emulsion, liposomes, and an aluminum salt.
- 5 10 An immunogenic composition as claimed herein for use as a medicament.
- 11 A vaccine comprising the immunogenic composition of claims 1-9
- 10 12 A method of preventing or ameliorating *Streptococcus pneumoniae* infection in a patient over 55 years, comprising administering an effective amount of a vaccine comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and
15 optionally a TH1 inducing adjuvant.
- 13 Use of a pneumococcal polysaccharide antigen in combination with a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and
20 Sp133, and optionally a TH1 inducing adjuvant, in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of pneumonia in patients over 55 years.
- 14 Use of a pneumococcal polysaccharide antigen in combination with a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of
25 PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a TH1 inducing adjuvant, in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of otitis media in infants or toddlers
- 15 A method of making an immunogenic composition as claimed herein,
30 comprising the steps of
 selecting one or more pneumococcal polysaccharide antigen(s),

selecting one or more pneumococcal protein antigen(s) from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and

mixing said polysaccharide and protein antigens with a suitable excipient.

5

16 A method of preventing or ameliorating Otitis media in Infants, comprising administering a safe and effective amount of a vaccine comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpaA, LytB, LytC,
10 LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, optionally with a TH1 adjuvant, to said Infant.

VACUNA

CAMPO DEL INVENTO

5

El presente invento se relaciona con vacunas de antígenos polisacáridos bacterianos, su fabricación y el uso de tales polisacáridos en medicinas

En particular el presente invento se relaciona con
10 vacunas que comprenden un antígeno polisacárido, típicamente un antígeno conjugado polisacárido de pneumococo, formulado con un antígeno proteico a partir de *Streptococcus pneumoniae* y opcionalmente un coadyuvante inductor de Th1

15 FUNDAMENTO DEL INVENTO

Streptococcus pneumoniae es una bacteria gram positiva responsable de considerable morbilidad y mortalidad (particularmente en jóvenes y la tercera edad), produciendo
20 enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteremia y meningitis, y enfermedades asociadas con colonización, tales como otitis media aguda. La tasa de neumonía de pneumococo en los Estados Unidos para personas mayores de 60 años es estimada entre 3 y 8 por 100 000. En 20% de los casos esto
25 lleva a bacteremia, y otras manifestaciones tales como meningitis, con la tasa de mortalidad cercana a 30% aún con tratamiento antibiótico.

El neumococo está encapsulado con un polisacárido químicamente ligado el cual confiere la especificidad de
30 serotipo. Existen 90 serotipos conocidos de neumococos, y la cápsula es el determinante de virulencia de origen para los neumococos, puesto que no solamente protege la superficie

interior de la bacteria del complemento, sino que ella misma es deficientemente inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos T-independientes, y no pueden ser procesados o presentados sobre moléculas MHC para interactuar con células-

5 T Sin embargo éstos pueden estimular el sistema inmune a través de un mecanismo alterno el cual involucra entrecruzamiento de receptores de superficie sobre células B

Se mostró en varios experimentos que la protección contra enfermedad por neumococos invasivos está relacionada
10 más fuertemente con el anticuerpo específico para la cápsula, y la protección es serotipo específica

Las vacunas basadas en antígenos polisacáridos son bien conocidas en el estado de la técnica. Cuatro que han sido aprobadas para uso humano incluyen el polisacárido Vi de
15 *salmonella typhi*, el polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae*, la vacuna tetravalente de meningococo compuesta de los serotipos A, C, W135 e Y, y la vacuna de pneumococo 23-valente compuesta de los polisacáridos que corresponden a los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A,
20 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, y 33 (explicando al menos 90% de los aislados sanguíneos de pneumococo)

Las últimas tres vacunas confieren protección contra bacterias que producen infecciones respiratorias resultando
25 en severa morbilidad y mortalidad en bebés, sin embargo éstas vacunas no han sido aprobadas para utilizar en niños menores de dos años puesto que son inadecuadamente inmunogénicas en este grupo de edad [Peltola (1984), N Engl J Med 310 1561-1566]. El *Streptococcus pneumoniae* es la causa más
30 común de enfermedad bacteriana invasiva y otitis media en bebés y niños de corta edad. Igualmente, las la tercera edad mostraron respuestas deficientes a vacunas de pneumococo

[Roghmann, (1987), J Gerontol 42 265-270], de aquí la incidencia aumentada de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62 271-285]

Las estrategias que han sido diseñadas para superar esta
 5 carencia de inmunogenicidad en niños, incluyen el enlace del polisacárido a grandes proteínas inmunogénicas, lo cual proporciona ayuda de células-T circundantes e induce memoria inmunológica contra el antígeno polisacárido con el cual
 10 están conjugadas Las vacunas de conjugados de glicoproteínas de pneumococo actualmente están siendo evaluadas en cuanto a seguridad, inmunogenicidad y eficacia en varios grupos de edad

La vacuna de pneumococo no conjugada 23-valente ha mostrado una amplia variación en eficacia clínica, entre 0% y
 15 81% (Fedson (1994) Arch Intern Med 154 2531-2535) La eficacia parece estar relacionada con el grupo de riesgo que se está inmunizado, tal como la tercera edad, enfermedad de Hodgkin, esplenectomía, enfermedad de células falciformes y agamaglobulinémicos (Fine (1994) Arch Intern Med 154 2666-
 20 2677), y también con la manifestación de la enfermedad La vacuna 23-valente no demuestra protección contra enfermedades como neumonía de pneumococo (en ciertos grupos de alto riesgo tales como las la tercera edad) y otitis media

Por lo tanto existe la necesidad de composiciones de
 25 vacunas de pneumococo mejoradas, particularmente aquellas que serán más efectivas para la prevención o alivio de enfermedad de pneumococo (particularmente neumonía) en la tercera edad y en niños de corta edad

El presente invento proporciona tal vacuna mejorada

30

RESUMEN DEL INVENTO

Por consiguiente el presente invento proporciona una composición de vacunas, que comprende al menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* (preferiblemente conjugado con un vehículo proteico) y un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consta de la familia de triada de polihistina (Pht, ej , PhtA, PhtB, phtD, o PhteE), familia Lyt (ej , LytA, LytB, o LytC), SpsA, Sp128, Sp130, Sp125, Sp101 y Sp133, o truncada (proteína interrumpida) o equivalente inmunológicamente funcional del mismo, opcionalmente con un coadyuvante Th1 (un coadyuvante que induce una respuesta inmune predominantemente Th1) Preferiblemente, tanto una proteína de pneumococo y el coadyuvante Th1 son incluidos Composiciones ventajosas que comprenden combinaciones de las anteriores proteínas neumocócicas del invento entre sí y con otras proteínas neumocócicas también son descritas Las composiciones del invento son particularmente apropiadas para el tratamiento de neumonía en la tercera edad

Las vacunas de polisacáridos neumocócicos (conjugadas o no) pueden no proteger contra neumonía en la población de la tercera para la cual la incidencia de esta enfermedad es muy alta El mecanismo de defensa clave contra el neumococo es la opsonofagocitosis (un evento mediado por células-B humores /neutrófilos causado por la producción de anticuerpos contra el polisacárido neumocócico, siendo fagocitada eventualmente la bacteria), sin embargo partes de los mecanismos opsónicos involucrados son deteriorados en la tercera edad, es decir producción de superóxidos mediante PMN (células polimorfonucleares), otra producción de especies oxígeno-activas, movilización de PMN, apoptosis de PMNs, deformabilidad de PMNs Las respuestas de anticuerpos también pueden ser deterioradas en la tercera edad

Contrario al dogma normalmente aceptado, los niveles normales de anticuerpos de polisacáridos anti-capsulares pueden no ser efectivos para completar la depuración de las bacterias, puesto que los neumococos pueden invadir las células hospederas para evadir esta rama del sistema inmune

Sorprendentemente, los actuales inventores han encontrado que estimulando simultáneamente la rama celular del sistema inmune (por ejemplo inmunidad mediada por células-T) además de la rama humoral del sistema inmune (mediada por células-B), se puede producir una sinergia (o cooperación) la cual puede aumentar la depuración de neumococos desde el hospedero. Este es un descubrimiento el cual ayudará a la prevención (o tratamiento) de infección por neumococo en general, pero será particularmente importante para la prevención (o tratamiento) de la neumonía en la tercera edad donde las vacunas basadas en polisacáridos no muestran eficacia

Sin desear estar limitados por cualquier teoría, los actuales inventores han encontrado que ambas ramas del sistema inmune pueden sinergizar en esta forma si un polisacárido de pneumococo (preferiblemente conjugado con un vehículo proteico) es administrado con una proteína neumocócica seleccionada del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133 (las proteínas pueden ser procesadas y presentadas en el contexto de Clase II y MHC clase I sobre la superficie de células mamíferas infectadas). Aunque una o más de estas proteínas neumocócicas puedan disparar la inmunidad mediada por células por sí misma, los inventores también han encontrado que la presencia de un coadyuvante inductor Th1 en la formulación de vacuna asiste a esta rama del sistema inmune, y sorprendentemente aumenta además la sinergia entre

ambas ramas del sistema inmune

DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

5 El presente invento proporciona una vacuna mejorada particularmente para la prevención o mejora de infección por pneumococo en la tercera edad (y/o bebés y niños de corta edad)

10 En el contexto del invento un paciente es considerado de la tercera edad si tiene 55 o más años de edad, típicamente más de 60 años y generalmente más de 65 años

Por lo tanto en una realización del invento se proporciona una composición de vacuna, apropiada para utilizar en la tercera edad (y/o bebés y niños de corta edad) 15 que comprende al menos un antígeno de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y al menos un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133 La vacuna puede opcionalmente 20 comprender un coadyuvante Th1

En una segunda realización preferida, el presente invento proporciona una vacuna (apropiada para la prevención de neumonía en la tercera edad) que comprende al menos un (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) antígeno(s) polisacárido de 25 *Streptococcus pneumoniae* y al menos un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133 y, preferiblemente, un coadyuvante Th1

30 En las anteriores realizaciones las vacunas ventajosamente comprendiendo combinaciones de las anteriores proteínas de pneumococo del invento entre sí y con otras

proteínas de pneumococo son contempladas a continuación

Se contempla que tal vacuna también será útil en el tratamiento de infección de pneumococo (por ejemplo otitis media) en otros grupos de alto riesgo de la población, tal como bebés o niños de corta edad

Antígenos polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* y del invento

Típicamente la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* del presente invento comprende antígenos polisacáridos (preferiblemente conjugados con una proteína portadora), en donde los polisacáridos son derivados a partir de al menos cuatro serotipos de neumococo. Preferiblemente los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. Más preferiblemente, al menos siete serotipos son incluidos en la composición, por ejemplo aquellos derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F. Más preferiblemente aún, al menos 11 serotipos son incluidos en la composición, por ejemplo la composición en una realización incluye polisacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (conjugados preferiblemente con una proteína portadora). En una realización preferida del invento al menos 13 antígenos polisacáridos (preferiblemente conjugados con una proteína portadora) (son incluidos, aunque antígenos polisacáridos adicionales, por ejemplo antígenos 23-valentes (tales como serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F), también son contemplados por el invento.

Para vacunación de la tercera edad (por ejemplo para la prevención de neumonía) es ventajoso incluir los serotipos 8 y 12F (y más preferiblemente 15 y 22 también) a la composición antigénica 11-valente descrita anteriormente para

formar una vacuna 15 valente, mientras para bebés o niños de corta edad (donde la otitis media es de mayor interés) los serotipos 6A y 19A son ventajosamente incluidos para formar una vacuna 13 valente

- 5 Aunque los anteriores polisacáridos pueden ser utilizados en su total longitud, forma nativa, se debe entender que los polisacáridos de tamaño reducido también pueden ser utilizados siempre y cuando sean aún inmunogénicos (ver por ejemplo EP 497524 y 497525)
- 10 Para la prevención/alivio de neumonía en personas de edad adulta (+55 años) y otitis media en bebés (hasta 18 meses) y niños de corta edad (típicamente 18 meses a 5 años), es una realización preferida de invento combinar un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* multivalente como se
- 15 describió en la presente con una proteína de *Streptococcus pneumoniae* seleccionada del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133, o equivalente inmunológicamente funcional del mismo Una combinación de proteínas de pneumococo también
- 20 pueden ser ventajosamente utilizadas como se describe más adelante

Proteínas neumocócicas del invento

- 25 Para los propósitos de este invento, "equivalente inmunológicamente funcional" es definido como un péptido proteico que comprende al menos un epítipo protector de las proteínas de invento Tales epítopos característicamente son de superficie expuesta, altamente conservados, y pueden
- 30 producir una respuesta de anticuerpos bactericida en un hospedero o prevenir efectos tóxicos Preferiblemente, el equivalente funcional tiene al menos 15 y preferiblemente 30

o más aminoácidos contiguos de la proteína del invento Más
preferible, fragmentos, deleciones de la proteína, tales como
variantes de deleción de transmembrana de la misma (es decir,
el uso del dominio extracelular de las proteínas), fusiones,
5 derivados química o genéticamente detoxificados y similares
pueden ser utilizados siempre y cuando sean capaces de elevar
sustancialmente la misma respuesta inmune que la proteína
nativa La posición de los epítomos de células-B potenciales
en una secuencia proteica puede ser fácilmente determinada
10 mediante la identificación de péptidos que son tanto de
superficie expuesta como antigénicos utilizando una
combinación de dos métodos predicción de estructuras-2D y
predicción de índice antigénico La predicción de estructuras
2D puede ser hecha utilizando un programa PSIPRED (de David
15 Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept de Ciencias
Biológicas, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK) El
índice antigénico puede ser calculado sobre la base del
método descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4 181-186 [1988])

Las proteínas del invento son las siguientes proteínas,
20 todas son expuestas sobre la superficie exterior del
neumococo (capaces de ser reconocidas por el sistema inmune
del hospedero durante al menos parte del ciclo de vida del
neumococo), o son proteínas las cuales son secretas o
liberadas por el neumococo

25 La proteína *Streptococcus pneumoniae* del invento
preferiblemente es seleccionada del grupo que consta de una
proteína de la familia de triada de polihistidina (Pht), una
proteína de la familia Lyt, una proteína con unión de colina,
proteínas que tienen un motivo LPXTG (donde X es cualquier
30 aminoácido) de proteínas que tienen un motivo de LXXC de
secuencia de Señal Tipo II (donde X es cualquier aminoácido),
y proteínas con un motivo de secuencia de Señal Tipo I

Ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas (truncado o equivalente inmunológicamente funcional del mismo)

La familia Pht (triada de polihistidina) comprende proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia está caracterizada por una secuencia de lipidación (secuencia encargada de unir o adicionar lípidos), dos dominios separados por una región rica en prolina y varias triadas de histidina, posiblemente involucrada en unión de metales o nucleósidos o actividad enzimática, (3-5) regiones coiled-coil (doble alfa hélice), un N-terminal conservado y un C-terminal heterogéneo. Presente en todas las cepas de neumococos probados. También se han encontrado proteínas homólogas y otros *Streptococos* y *Neisseria*. Los miembros preferidos de la familia comprenden PhtA, PhtB y PhtD. Más preferiblemente, ésta comprende PhtA o PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos PhtA, B, D, y E se refieren a proteínas con secuencias divulgadas en las referencias a continuación así como también a variantes naturales (y artificiales) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es al menos 90% idéntica a las proteínas citadas. Preferiblemente es al menos 95% idéntica y más preferiblemente es 97% idéntica.

Con respecto a las proteínas Pht, PhtA se divulga en WO 98/18930, y también se relaciona con Sp36. Como se anotó anteriormente, ésta es una proteína de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo de LXXC de Señal tipo II.

PhtD se divulga en WO 00/37105, y también está relacionada con Sp036D. Como se anotó anteriormente, ésta también es una proteína de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo LXXC de Señal tipo II.

PhtB se divulga en WO 00/37105, y también está

relacionada con Sp036B Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido de degradador de C3, como se divulga en WO 00/17370 Esta proteína también es de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo de LXXC de Señal tipo II Un
5 equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína Sp42 divulgada en WO 98/18930 Un truncado de PhtB (aproximadamente 79kD) es divulgado en WO99/15675 el cual también es considerado un miembro de la familia PhtX

PhtE se divulga en WO00/30299 y es conocida como BVH-3

10 SpsA es una proteína con unión de colina (Cbp) divulgada en WO 98/39450

La familia Lyt son proteínas asociadas con membrana y con lisis celular El dominio N-terminal comprende dominio de unión de colina, sin embargo la familia no tiene todas las
15 características encontradas en la familia de proteínas de unión de colina observada más adelante y por lo tanto para el presente invento, la familia Lyt es considerada distinta de la familia Cbp En contraste con la familia Cbp, el dominio C-terminal contiene el dominio catalítico de la familia
20 proteica Lyt La familia comprende LytA, B y C Con respecto a la familia Lyt, LytA es divulgada en Ronda, Eur J Biochem, 164 621-624 (1987) LytB es divulgada en WO 98/18930, y también es conocida como Sp46 LytC también es divulgada en WO 98/18930, y también es conocida como Sp91 Un miembro
25 preferido de esa familia es LytC

Otra realización preferida son los truncados de la familia Lyt en donde "Lyt" se define como antes y "truncados" se refiere a proteínas que carecen de 50% o más de la región de unión de Colina

30 Sp125 es un ejemplo de una proteína de superficie de pneumococo con el motivo de LPXTG de Anclaje de Pared Celular (en donde X es cualquier aminoácido) Cualquier proteína con

esta clase de proteína de superficie de pneumococo con este motivo ha sido encontrada como útil dentro del contexto del invento, y por lo tanto es considerada una proteína adicional del invento Sp125 misma es divulgada en WO 98/18930, y

5 también es conocida como ZmpB - una metaloproteínasa de zinc

Sp101 es divulgada en WO 98/06734 (donde ésta tiene la referencia # y85993 Se caracteriza por una secuencia de señales de Tipo I

10 Sp133 es divulgada en WO 98/06734 (donde tiene una referencia # y85992 También se caracteriza por una secuencia de señales Tipo I

Sp128 y Sp130 son divulgadas en WO 00/76540

Las proteínas utilizadas en el presente invento preferiblemente son seleccionadas del grupo PhtD y PhtA, o
15 una combinación de estas dos proteínas

Combinación ventajosa de una o más proteínas de pneumococo del invento con otras proteínas de pneumococo

20 En la vacuna del invento, cada una de las anteriores proteínas del invento (preferiblemente cualquiera o ambas PhtD y PhtA) también pueden ser benéficamente combinadas con una o más proteínas de pneumococo de la siguiente lista
neumolisina (también conocida como Ply, preferiblemente
25 detoxificada mediante tratamiento químico o mutación) [WO 96/05859, WO 90/06951, WO 99/03884], PsaA y variantes de delección de transmembrana de la misma (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec, 64(12) 5255-62), PspA y variantes de delección de transmembrana de la misma (US 5804193, WO
30 92/14488, WO 99/53940), PspC y variantes de delección de transmembrana de la misma (WO 97/09994, WO 99/53940), un miembro de la familia de proteínas de unión de colina (Cbp)

[e] CpbA y variantes de delección de transmembrana de la misma (WO 97/41151, WO 99/51266)], Gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa (Infect Immun 1996 64 3544), HSP70 (WO 96/40928), PcpA (Sanchez-Beato, *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164 207-14), M como proteína (solicitud de patente SB No EP 0837130), adhesina 18627 (solicitud de patente SB No EP 0834568) El presente invento también incluye equivalentes inmunológicamente funcionales o truncados de tales proteínas (como se definió anteriormente)

10 Con respecto a la familia de proteínas de unión de colina, los miembros de esa familia fueron originalmente identificados como proteínas de pneumococo que podían ser purificadas mediante cromatografía de afinidad por colina. Todas las proteínas de unión de colina están no

15 covalentemente unidas a radicales de fosforilcolina de ácido teicóico de pared celular y ácido lipoteicóico asociado a membrana. Estructuralmente, éstas tienen varias regiones en común sobre toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia aminoácida, longitud, etc) puede

20 variar. En general, las proteínas de unión de colina comprenden una región N terminal (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión de colina conservada (C), compuesta de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la

25 mitad de la proteína. Como se utiliza esta solicitud, el término "familia de proteína de unión de colina (Cbp)" es seleccionado del grupo que consta de proteínas de unión de colina como se identifican en WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. CbpA es divulgada en WO 97/41151. CbpD y

30 CbpG son divulgadas en WO 00/29434. PspC es divulgada en WO 97/09994. PbcA es divulgada en WO 98/21337. Preferiblemente las proteínas de unión de colina son seleccionadas del grupo

que consta de CbpA PbcA, SpsA y PspC

Si un Cbp es la proteína adicional utilizada ésta puede ser un truncado Cbp en donde "Cbp" es como se definió anteriormente y "truncado" se refiere a proteínas que carecen

5 de 50% o más de la región de unión de colina (C) Preferiblemente tales proteínas carecen de toda la región de unión de colina Más preferiblemente, tales truncados proteicos carecen de (i) la región de unión de colina y (ii) una porción de la mitad N-terminal de la proteína también,

10 sin embargo retienen al menos una región de repetición (R1 o R2) Más preferiblemente aún, el truncado tiene dos regiones de repetición (R1 y R2) Ejemplos de tales realizaciones preferidas son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, otras proteínas de unión de colina

15 que carecen de una región de unión de colina similar también son contempladas dentro del alcance de este invento

Las proteínas quiméricas del truncado Cbp - truncado Lyt (o fusiones) también pueden ser utilizadas en la vacuna del invento Preferiblemente esta comprende NR1xR2 (o R1xR2) de

20 Cbp y la porción C-terminal (Cterm, es decir, que carece de dominios de unión de colina) de Lyt (ej , LytCCterm o Sp91Cterm) Más preferiblemente Cbp es seleccionada del grupo que consta de CbpA, PbcA, SpsA y PspC Más preferiblemente aún, ésta es CbpA Preferiblemente, Lyt es LytC (también

25 conocida como SP91)

Una PspA o truncado de PsaA que carece del dominio de unión de colina (C) y expresada como una proteína de fusión con Lyt también puede ser utilizada Preferiblemente, Lyt es LytC

30

Combinaciones preferidas de proteínas de pneumococo para los propósitos de este invento

Preferiblemente la combinación de proteínas del invento es seleccionada entre 2 o más (3 o 4) categorías diferentes tales como proteínas con un motivo de LXXC de secuencia de Señal tipo OO (donde X es cualquier aminoácido, ej , la familia de triada de polihistidina (Pht)), proteínas de unión de colina (Cbp), proteínas con un motivo de secuencia de Señal Tipo I (ej , Sp101), proteínas con un motivo LPXTG (donde X es cualquier aminoácido, ej , Sp128, Sp130), toxinas (ej , Ply), etc Ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las proteínas antes mencionadas, o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas Toxina + Pht, toxina + Cbp, Pht + Cbp, y toxina + Pht + Cbp son combinaciones de categorías preferidas

Combinaciones benéficas preferidas incluyen, pero no están limitadas a proteínas quiméricas o de fusión de PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm, proteínas quiméricas o de fusión de PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA Preferiblemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC Más preferiblemente es de CbpA

Una combinación particularmente preferida de proteínas de pneumococo comprende Ply (o un truncado o equivalente inmunológicamente funcional del mismo) + PhtD (o un truncado o equivalente inmunológicamente funcional del mismo) + NR1xR2 (o R1xR2) Preferiblemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC Más preferiblemente es de CbpA

Sin desear estar limitado por alguna teoría, dentro de la composición, la proteína de pneumococo (o combinaciones descritas anteriormente) del invento puede ayudar a inducir

una respuesta mediada por células-T contra enfermedad de pneumococo - particularmente requerida para protección contra neumonía - la cual coopera con la rama humoral del sistema inmune para inhibir invasión por neumococos, y para estimular opsonofagocitosis. Una ventaja adicional de incluir el antígeno proteico es la presentación de antígenos adicionales para el proceso de opsonofagocitosis.

Por consiguiente en la realización del invento se proporciona una vacuna de *streptococcus pneumoniae* que comprende una vacuna conjugada de polisacárido de pneumococo que comprende antígenos polisacáridos derivados de al menos cuatro serotipos, preferiblemente al menos siete serotipos, más preferiblemente al menos once serotipos, y al menos uno, pero preferiblemente 2, 3, o 4, proteínas de *streptococcus pneumoniae* seleccionadas del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133 (o una combinación de proteínas de pneumococo como se describió anteriormente). Preferiblemente una de las proteínas es PhtA (o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma). Más preferiblemente una de las proteínas es PhtD (o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma).

Como se mencionó anteriormente, un problema asociado con el enfoque de polisacáridos para vacunación, es el hecho que los polisacáridos *per se* son inmunógenos deficientes. Para superar esto, los polisacáridos pueden ser conjugados con vehículos proteicos, los cuales proporcionan ayuda de células-T circundantes. Se prefiere por lo tanto, que los polisacáridos utilizados en el invento estén ligados a tal vehículo proteico. Ejemplos de tales vehículos los cuales son actualmente comúnmente utilizados para la producción de inmunógenos de polisacáridos incluyen los toxoides de

Difteria y Tétanos (DT, DT CRM197 y TT respectivamente),
Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), OMPC de *N meningitidis*, y
el derivado proteico purificado de Tuberculina
(PPD)

5 Un vehículo preferido para composiciones inmunogénicas
basadas en polisacáridos de pneumococo (o vacunas) es la
proteína D de *Haemophilus influenzae* (EP 594610-B), o
fragmentos de la misma. Fragmentos apropiados para utilizar
incluyen fragmentos que abarcan epítomos T-auxiliares. En
10 particular un fragmento D proteico preferiblemente contendrá
1/3 N-terminal de la proteína. Un vehículo D proteico es
sorprendentemente útil como un vehículo en vacunas donde
múltiples antígenos polisacáridos de pneumococo son
conjugados. La supresión de epítomos usualmente tiene
15 probabilidad de ocurrir si el mismo vehículo es utilizado
para cada polisacárido. Sorprendentemente, los actuales
inventores han encontrado que la proteína D es
particularmente apropiada para minimizar tales efectos de
supresión epitópica en vacunas de combinación. Uno o más
20 polisacáridos de pneumococo en una combinación pueden ser
ventajosamente conjugados sobre la proteína D, dentro de tal
vacuna de combinación.

Un vehículo adicional preferido para el polisacárido de
pneumococo es la proteína de pneumococo misma (como se
25 definió anteriormente en la sección "proteínas de pneumococo
del invento").

El polisacárido puede estar enlazado con la proteína
portadora mediante cualquier método conocido (por ejemplo,
por Likhite, Patente U S 4 372 945 y por Armor, Patente U S
30 4 474 757). Preferiblemente, la conjugación de CDAP es
llevada a cabo (WO 95/08348).

Preferiblemente la proporción proteína polisacárido

(peso peso) de los conjugados es 0 3 1 a 1 1, más preferiblemente 0 6 1 a 0 8 1, y lo más preferiblemente 0 7 1 aproximadamente

Las vacunas del presente invento preferiblemente son
 5 coadyuvadas Coadyuvantes apropiados incluyen una sal de aluminio de tal como gel de hidróxido de aluminio (alum) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, magnesio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados,
 10 polisacáridos catiónica o aniónicamente derivados, o polifosfacenos

Se prefiere que el co-adyuvante sea seleccionado para ser un inductor preferencial de un tipo TH1 de respuesta para asistir con la rama celular de la respuesta inmune

15

Coadyuvantes TH1 del Invento

Los altos niveles de citoquinas tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes mediadas por células para un antígeno dado, mientras altos niveles de
 20 citoquinas tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales para el antígeno

Es importante recordar que la distinción de respuesta inmune tipo Th1 y Th2 no es absoluta En realidad un individuo dará soporte a una respuesta inmune la cual es
 25 descrita como predominantemente Th1 o predominantemente Th2 Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de aquello descrito en clones de células T CD4 +ve murinas por Mosmann y Coffman (Mosmann, T R y Coffman, R L (1989) células TH1 y TH2 diferentes
 30 patrones de secreción de linfoquinas lleva a diferentes propiedades funcionales Reseña Anual de Inmunología, 7 p145-173) Tradicionalmente, las respuestas tipo Th1 están

50
47

asociadas con la producción de las citoquinas INF- γ y IL-2 por T-linfocitos. Otras citoquinas a menudo directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunes tipo Th1 no son producidas por las células-T, tales como IL-12. En
5 contraste, las respuestas tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Sistemas coadyuvantes apropiados que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen lípido A de monofosforilo o un derivado del mismo, particularmente lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación ver GB 2220211 A), y una
10 combinación de lípido A de monofosforilo, preferiblemente lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado, junto con sal de aluminio (por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En tales
15 combinaciones, antígeno y 3D-MPL son contenidos en las mismas estructuras particuladas, permitiendo liberación más eficiente de señales antigénicas e inmunoestimulantes. Estudios han mostrado que 3D-MPL puede aumentar adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno alum-
20 absorbido [Thoelen Vaccine (1998) 16 108-14, EP 689454-B1]

Un sistema aumentado involucra la combinación de un lípido A de monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en WO 94/00153, o una composición menos reactogénica
25 donde el QS21 es apagado con colesterol como se divulga en WO 96/33739

Una formulación coadyuvante particularmente potente que involucra Qs21, 3D-MPL y tocoferol en un aceite en emulsión de agua es descrita en WO 95/17210, y es una formulación
30 preferida

Preferiblemente la vacuna adicionalmente comprende una saponina, más preferiblemente QS21. La formulación también

puede comprender un aceite en emulsión de agua y tocoferol (WO 95/17210)

El presente invento también proporciona un método para producir una formulación de vacuna que comprende la mezcla de una proteína del presente invento junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como 3D-MPL

Oligonucleótidos no metilados que contienen CpG (WO 96/02555) son también inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son apropiados para utilizar en el presente invento

Composiciones particularmente preferidas del invento comprenden uno o más polisacáridos de pneumococo conjugados, una o más proteínas de pneumococo del invento y un coadyuvante Th1 Sin desear ser limitados por alguna teoría, la inducción de una respuesta mediada por células por medio de una proteína de pneumococo (como se describió anteriormente) y la cooperación entre ambas ramas del sistema inmune puede ser asistida utilizando tal coadyuvante Th-1, resultando en una vacuna particularmente efectiva contra la enfermedad de pneumococo en general, y, más importante, contra neumonía de pneumococo en la tercera edad

En un aspecto adicional del presente invento se proporciona un inmunógeno o vacuna como se describe en la presente para utilizar en medicina

En una realización se presenta un método de prevención o alivio de neumonía en un humano de la tercera edad (+55 años) que comprende la administración a dicho humano de una cantidad segura y efectiva de una vacuna, como se describe en la presente, que comprende un antígeno polisacárido de *streptococcus pneumoniae* y una proteína neumocócica seleccionada del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133, y

opcionalmente un coadyuvante Th1

En una realización adicional se proporciona un método para prevenir o aliviar la otitis media en bebés (hasta 18 meses) o niños de corta edad (típicamente entre 18 meses y cinco años), que comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de una vacuna a dicho bebé o niño que comprende un antígeno polisacárido de *streptococcus pneumoniae* y un antígeno proteico de *streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133, y opcionalmente un coadyuvante Th1

Preferiblemente en los métodos del invento como se describió anteriormente el antígeno polisacárido está presente como un conjugado proteico de polisacárido

Preparaciones de vacunas del invento

Las preparaciones de vacunas del presente invento pueden ser utilizadas para proteger o tratar un mamífero susceptible a infección, mediante la administración de dicha vacuna a través de ruta sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de rutas intramusculares, intraperitoneales, intradérmicas o subcutáneas, o a través de administración mucosa hacia los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. La administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media es preferida (puesto que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede ser más efectivamente prevenido, atenuando así la infección en primera etapa). Aunque la vacuna del invento puede ser administrada como una dosis única, los componentes de la misma también pueden ser co-administrados juntos al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo los polisacáridos de pneumococo podrían ser administrados

CP

separadamente al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración del componente proteico bacteriano de la vacuna para óptima coordinación de las respuestas inmunes entre sí) Para co-administración, el coadyuvante Th1

5 opcional puede estar presente en cualquiera o todas las administraciones diferentes, sin embargo se prefiere sí está presente en combinación con el componente proteico bacteriano de la vacuna Además de una única ruta de administración, dos rutas diferentes de administración pueden ser utilizadas Por
10 ejemplo, cualquier antígeno viral puede ser administrado de manera intradérmica (ID), mientras las proteínas bacterianas pueden ser administradas de manera intramuscular (IM) o intranasal (IN) Los polisacáridos pueden ser administrados IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden ser
15 administradas IN (o ID) Además, las vacunas del invento pueden ser administradas intramuscularmente para dosis iniciales e intranasalmente para dosis de refuerzo

La cantidad de antígeno conjugado en cada dosis de vacuna es seleccionada como una cantidad que induce una
20 respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos secundarios significativos en vacunas típicas Tal cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico empleado y la forma en que es presentado Generalmente, se espera que cada dosis comprenderá 0 1-100 µg de polisacárido, preferiblemente 0 1-
25 50 µg, preferiblemente 0 1-10 µg, de los cuales 1 a 5 µg es el rango más preferible

El contenido de antígenos proteicos en la vacuna típicamente estará en el rango entre 1-100µg, preferiblemente 5-50 µg, más típicamente en el rango entre 5-25µg

30 Las cantidades óptimas de componentes para una vacuna particular pueden ser investigadas mediante estudios

estándares que involucran observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente separadas

5 La preparación de vacuna generalmente es descrita en diseño de vacunas ("el enfoque de subunidad y coadyuvante) (eds Powell M F & Newman M J) (1995) Plenum Press New York) La encapsulación dentro de liposomas es descrita por Fullerton, Patente U S 4 235 877

10 Aunque las vacunas del presente invento pueden ser administradas mediante cualquier ruta, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización del presente invento La piel humana comprende una cutícula "callosa" exterior, llamada estrato córneo, el cual cubre la
15 epidermis Bajo esta epidermis se encuentra una capa llamada la dermis, la cual a su vez cubre el tejido subcutáneo Los investigadores han mostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y particularmente en la dermis, estimula una respuesta inmune, la cual también puede estar asociada con un
20 número de ventajas adicionales La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en la presente, forma una característica preferida del presente invento

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento mantoux", comprende los pasos de limpiar la
25 piel, y luego estirar con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre pequeño (calibre 26-31) hacia arriba, la aguja es insertada en un ángulo entre 10-15 grados Una vez el bisel de la aguja es insertado, el cuerpo de la aguja es bajado y empujado adicionalmente mientras se proporciona una
30 presión leve para elevarlo bajo la piel El líquido es luego inyectado muy lentamente formando así una ampolla o protuberancia sobre la superficie de la piel, seguido por el

52

retiro lento de la aguja

Más recientemente, se han descrito dispositivos que son específicamente diseñados para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección a chorro descritos por ejemplo en WO 01/13977, US 5 480 381, US 5 599 302, US 5 334 144, US 5 993 412, 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5 339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596, 556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 Y WO 97/13537 Métodos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para liberación balística de vacunas sólidas (WO 99/27961), o parches transdérmicos (WO 97/48440, WO 98/28037), o aplicadas a la superficie de la piel (liberación transdérmica o transcutánea WO 98/20734, WO 98/28037)

20 Cuando los vacunas del presente invento son para ser administradas a la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen líquido bajo, particularmente un volumen entre 0.05 ml y 0.2 ml

25 El contenido de antígenos en la piel o vacunas transdérmicas del presente invento puede ser similar a las dosis convencionales como se encontró en vacunas intramusculares Sin embargo, es una característica de vacunas de piel o intradérmicas que las formulaciones pueden estar en "dosis bajas" Por consiguiente los antígenos de proteínas en vacunas de "dosis bajas" preferiblemente están

30 presentes en tan poco como 0.1 y 10 µg, preferiblemente 0.1 y

5 µg por dosis, y los antígenos polisacáridos (preferiblemente conjugados) pueden estar presentes en el rango de 0.01-1µg, y preferiblemente entre 0.01 y 0.5 µg de polisacárido por dosis

5 Como se utiliza en la presente, el término "liberación intradérmica" significa liberación de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna necesariamente no estará localizada exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa en la piel localizada entre 1.0
10 y 2.0 mm desde la superficie en la piel humana, pero existe una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis a 1.5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis está localizada entre el estrato córneo y la
15 epidermis en la superficie y por debajo de la capa subcutánea. Dependiendo del modo de liberación, la vacuna puede generalmente ser localizada única o principalmente dentro de la dermis, o puede finalmente ser distribuida dentro de la epidermis y la dermis.

20 El presente invento también contempla vacunas de combinación las cuales proporcionan protección contra un rango de diferentes patógenos. Muchas vacunas pediátricas ahora son administradas como una vacuna de combinación para reducir el número de inyecciones que el niño tiene que
25 recibir. Así para vacunas pediátricas otros antígenos de otros patógenos pueden ser formulados con las vacunas del invento. Por ejemplo las vacunas del invento pueden ser formuladas con (o administradas separadamente pero al mismo tiempo) la conocida vacuna de combinación "trivalente" que
30 comprende el toxoide de la difteria (DT), toxoide de tétanos (TT), y componentes de tos ferina [típicamente toxoide de tos

ferina detoxificado (PT) y hemoglutinina filamentosa (FHA) con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinina 1+2], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa (SmithKlineBeecham Biologicals) la cual contiene antígenos de DT, TT, PT, FHA y PRN, o con un componente completo de tos ferina celular por ejemplo el comercializada por SmithKlineBeecham Biologicals s a , como Tritanrix La vacuna combinada también puede comprender otro antígeno, tal como el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), antígeno de poliovirus (por ejemplo poliovirus trivalente inactivo - IPV), proteínas de membrana exterior de *Moraxella catarrhalis*, proteínas de membrana exterior, proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificables, proteínas de membrana exterior de *N meningitidis* B

15 Ejemplos de antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* preferidos los cuales pueden ser incluidos en una vacuna de combinación (especialmente para prevención de otitis media) son OMP106 [Wom97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)], OMP21, LbpA &/o LbpB [WO 98/55606 (PMC)], TbpA &/o TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)], CopB [Helminen ME, (1993) Infect, Immun 61 2003-2010], UspA1 y/o UspA2 [WO 93/03761 (Universidad de Texas)], OmpCD, HsaR (PCT/EP99/03824), P11Q (PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 99179772 2), lipo10 (GB 9918208 1), lipo11 (GB 9918302 2), lipo 18 (GB 9918038 2), p6 (PCT/EP99/03038), D15 (PCT/EP99/03822), Omp1A1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), y OmpE Ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipificables los cuales pueden ser incluidos en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) incluyen proteína de Fimbrin [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma

30

SS

[ej fusiones de péptidos LB1(f), US 5843464 (OSU) o WO 99/64067], OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)], P6 [EP 281673 (State University of New York)], TbpA y/o TbpB, H1a, Hsf, Hin47, H1f, Hmw1, Hmw2, Hmw3, Hmw4, Hap, D15 (WO 94/12641),
 5 proteína D (EP 594610), P2, y P5 (WO 94/26304)

Otras combinaciones contempladas son el PS & proteína de pneumococo del invento en combinación con antígenos virales, por ejemplo, de influenza (atenuados, divididos, o subunidad [ej , glicoproteínas de superficie neuramidasasa (NA) y

10 hemaglutinina (HA)]) Ver, ej , Chaloupka I, Eur Jourtnal Clin Microbiol Infect Dis 1996, 15 121-127], RSV (ej , antígenos F y G o fusiones F/G, ver, ej, Schmidt A C , J Virol, May 2001, p4594 - 4603), PIV3 (ej, proteínas HN y F, ver Schmidt supra), Varicela (ej , glicoproteínas atenuadas
 15 I-V, etc), y cualquier (o todos) los componentes de MMR (sarampión, paperas, rubéola)

Una vacuna de combinación pediátrica preferida contemplada por el presente invento para tratamiento global o prevención de otitis media comprende uno o más antígenos
 20 polisacáridos de *streptococcus pneumoniae* preferiblemente conjugados con proteína D), una o más proteínas de pneumococo seleccionadas del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp126, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133 (o un equivalente inmunológicamente funcional del
 25 mismo), y uno o más antígenos de superficie expuesta de *Moraxella catarrhalis* y/o *Haemophilus influenzae* no tipificable La proteína D puede ventajosamente ser utilizada como un vehículo proteico para polisacáridos de pneumococo para superar los problemas de supresión de epítopos (como se
 30 mencionó anteriormente), y puesto que ésta es en sí misma un inmunógeno capaz de producir protección mediada por células-B contra *H influenzae* no tipificable (ntH1) Los antígenos de

Moraxella catarrhalis o *Haemophilus influenzae* no tipificable pueden ser incluidos en la vacuna en una forma de sub-unidad, o pueden ser agregados como antígenos presentes en la superficie de vesículas de membrana exterior (ampollas)

5 hechas a partir de las bacterias

Preferiblemente las composiciones antigénicas (y vacunas) anteriormente descritas son liofilizadas hasta que están a punto de ser utilizadas, punto en el cual son extemporáneamente reconstituidas con diluyente Más

10 preferiblemente son liofilizadas en presencia de 3D-MPL, y son extemporáneamente reconstituidas con solución salina

Alternativamente, la proteína y el polisacárido pueden ser almacenados separadamente en un kit (juego) de vacunación (cualquiera o ambos componentes siendo liofilizados), los

15 componentes siendo reconstituidos y mezclados antes de utilizar o administrados de manera separada al paciente Un coadyuvante Th1 (preferiblemente 3D-MPL) puede estar presente con cualquiera o ambos componentes

La liofilización de vacunas es bien conocida en el estado de la técnica Típicamente la vacuna líquida es secada por congelación en presencia de un agente anti-pelmazante por ejemplo azúcares tales como sacarosa o lactosa (presentes en una concentración inicial de 10-200 mg/mL) La liofilización típicamente ocurre sobre una serie de pasos, por ejemplo un

25 ciclo que comienza en -69°C, gradualmente ajustando a -24°C durante tres horas, luego reteniendo esta temperatura durante 18 horas, luego gradualmente ajustando a -16°C durante una hora, luego reteniendo esta temperatura durante seis horas, luego gradualmente ajustando a +34 °C durante 3 horas, y
30 finalmente reteniendo esta temperatura durante 9 horas

La liofilización de composiciones resulta en una composición más estable (por ejemplo previene la degradación

52

de los antígenos polisacáridos) El proceso también es sorprendentemente responsable de un mayor título de anticuerpos contra los polisacáridos de pneumococo Esto ha sido mostrado como particularmente significativo para conjugados PS 6B Otro aspecto del invento es así una composición antigénica liofilizada que comprende un conjugado PS 6B coadyuvado con 3D-MPL (preferiblemente desprovisto de coadyuvantes con base de aluminio) y una proteína de pneumococo seleccionada del grupo que consta de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133

EJEMPLOS

Los ejemplos ilustran, pero no limitan el invento

Ejemplo 1

Polisacárido capsular de *S pneumoniae*

La vacuna candidata 11-valente incluye los serotipos de polisacáridos capsulares 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F los cuales fueron hechos esencialmente como se describió en EP 72513 Cada polisacárido es activado y derivado utilizando química CDAP (WO 95/08348) y conjugado con un vehículo proteico Todos los polisacáridos son conjugados en su forma nativa, excepto para el serotipo 3 (el cual fue reducido en tamaño para disminuir su viscosidad)

El vehículo proteico seleccionado es la proteína D recombinante (PD) de *Haemophilus influenzae* no tipificable, expresada en *E coli*

EXPRESION DE PROTEINA D

Proteína D de *Haemophilus influenzae*

Construcción genética para expresión de proteína D

Materiales de inicio

El ADN de codificación de la Proteína D

La proteína D es altamente conservada entre *H influenzae* de todos los serotipos y cepas no tipificables. El vector pHIC348 que contiene la secuencia de ADN que codifica la totalidad del gen de la proteína D ha sido obtenido del Dr. Forsgren, Departamento de Microbiología Médica, Universidad de Lund, Hospital General de Malmö, Malmö, Suecia. La secuencia de ADN de la proteína D ha sido publicada por Kanson (1991) *Infect Immun* 59 119-125.

El vector de expresión mMGI

El vector de expresión pMGI es un derivado de pBR322 (Gross, 1985) en el cual los elementos de control derivados de bacteriófagos λ para transcripción y traducción de genes fueron introducidos (Shatzman, 1983). Además, el gen de resistencia a Ampicilina fue intercambiado con el gen de resistencia a canamicina.

La cepa AR58 de *E. coli*

La cepa AR58 de *E. coli* fue generada mediante transducción de N99 con una solución concentrada de bacteriófago P1 previamente cultivado sobre un derivado SA500 (gale⁻ TN10, λ K11 cI857 Δ H1). N99 y SA500 son cepas de *E. coli* K12 derivadas en el laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de la Salud (NIH, USA).

El vector de expresión pMG 1

Para la producción de la proteína D, el ADN que codifica la proteína ha sido clonado en el vector de expresión pMG 1. Este plásmido utiliza señales de ADN λ fago para impulsar

la transcripción y traducción de genes extraños insertados
 El vector contiene el promotor PL, operador OL y dos sitios
 de utilización (NutL y NutR) para aliviar efectos de
 polaridad transcripcional cuando la proteína N es
 5 proporcionada (Gross, 1985) Los vectores que contienen el
 promotor PL, son introducidos en el hospedero lisogénico de
E coli para estabilizar el plásmido de ADN Las cepas
 hospederas lisogénicas contienen ADN lambdafago de
 replicación defectuosa integrado en el genoma (Shatzman,
 10 1983) El ADN lambdafago cromosomal direcciona la síntesis de
 la proteína represora cI la cual se une al represor OL del
 vector y previene la unión de ARN polimerasa al promotor PL
 y de esta forma la transcripción del gen insertado El gen cI
 de la cepa de expresión AR58 contiene un mutante sensible a
 15 temperatura de manera que la transcripción dirigida por PL
 puede ser regulada mediante un cambio de temperatura, es
 decir, un aumento en temperatura de cultivo inactiva el
 represor y la síntesis de la proteína extraña es iniciada
 Este sistema de expresión permite síntesis controlada de
 20 proteínas extrañas especialmente de aquellas que pueden ser
 tóxicas para la célula (Shimataka & Rosenberg, 1981)

La cepa AR58 de *E coli*

La cepa de *E coli* lisogénica AR58 utilizada para la
 25 producción del vehículo de la proteína D es un derivado de la
 cepa N99 de *E coli* K12 NIH (F su galK2, lacZthr) Esta
 contiene un lambdafago lisogénico defectuoso (galE TN10,
 lambdaK11 cI857 ΔH1) El fenotipo K11⁻ evita la terminación
 de la síntesis macromolecular del hospedero La mutación
 30 cI857 le confiere una lesión sensible a temperatura al
 represor cI La delección de ΔH1 remueve el operón derecho de

lambdafago y los sitios bio, uvr3, y chlA del hospedero
La cepa AR58 fue generada mediante transducción de N99 con
una solución concentrada de bacteriófago P1 previamente
cultivado sobre un derivado SA500 (galE TN10, lambdaK11

- 5 cI857 AH1) La introducción del lisógeno defectuoso en N99
fue seleccionada con tetraciclina en virtud de la presencia
de un transposón TN10 que codifica para resistencia a
tetraciclina en el gen galE adyacente

10 Construcción del vector pMGMDPPrD

El vector pMG 1 el cual contiene el gen que codifica la
proteína S1 no estructural del virus Influenzae (pMGNSI) fue
utilizado para construir pMGMDPPrD El gen de la proteína D
fue amplificado mediante PCR a partir del vector pHC348

- 15 (Janson, 1991) con cebadores PCR que contienen sitios NcoI y
XbaI en los terminales 5' y 3', respectivamente El fragmento
NcoI/XbaI fue luego introducido en pMGNSI entre NcoI creando
así una proteína de fusión que contiene 81 aminoácidos N-
terminales de la proteína NS1 seguida por la proteína PD

- 20 Este vector se rotuló pMGNS1PrD

Con base en la construcción descrita anteriormente se
generó la construcción final para la expresión de la proteína
D Un fragmento BamHI/BamHI fue removido de pMGNS1PrD Esta
hidrólisis de ADN remueve la región de codificación NS1,
25 excepto para los primeros tres residuos N-terminales Ante
religación del vector se generó un gen que codifica una
proteína de fusión con la siguiente secuencia de aminoácidos
N-terminales

- 30 ----MDP SSHSSNMANT-----

NS1 proteína D

La proteína D no contiene un péptido líder o la cisteína N-terminal a la cual las cadenas lípidas están normalmente unidas. Por lo tanto la proteína no es excretada en el periplasma ni lipídada y permanece en el citoplasma en una forma soluble

La construcción final pMG-MDPPrD fue introducida en la cepa hospedera AR58 mediante choque de térmico a 37°C. Bacterias conteniendo plásmido fueron seleccionadas en presencia de Kanamicina. La presencia de la proteína D que codifica el inserto de ADN fue demostrada mediante la digestión de plásmido de ADN aislado con endonucleasas seleccionadas. La cepa de *E. coli* es conocida como ECD4

La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor lambda PL/Operador OL. La cepa hospedera AR58 contiene un gen cI sensible a temperatura en el genoma el cual bloquea la expresión de Lambda P_L a baja temperatura mediante unión a O_L. Una vez la temperatura es elevada cI es liberado de O_L y la proteína D es expresada. Al final de la fermentación las células son concentradas y congeladas

La extracción de las células cosechadas y la purificación de la proteína D fue realizada como sigue. El pellet de cultivo celular congelado es descongelado y resuspendido en una solución de disrupción celular (amortiguador de citrato pH 6.0) a un OD₆₅₀ final = 60. La solución es pasada dos veces a través de un homogenizador de alta presión a P = 1000 barios. El homogenato de cultivo celular es clarificado mediante centrifugación y los desechos celulares son removidos mediante filtración. En el primer paso de purificación el lisato filtrado es aplicado a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Flujo Rápido de Sefarosa SP). PD se une a la matriz de gel mediante interacción iónica y es eluida por un aumento gradual de la

672

fuerza iónica del amortiguador de elusión

En un segundo paso de purificación las impurezas son retenidas sobre una matriz de intercambio aniónico (Flujo Rápido de Sefarosa Q) PD no se une sobre el gel y puede ser recolectado en el flujo que pasa a través

En ambos pasos de cromatografía en columna, la recolección de fracciones es monitoreada por OD El flujo que pasa a través de la cromatografía en columna de intercambio iónico que contiene la proteína D purificada es concentrado por ultrafiltración

Química

Química de Activación y acoplamiento

Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas para cada polisacárido Estas son dadas en la tabla 1 El polisacárido nativo (excepto para PS3) fue disuelto en agua para inyección La concentración óptima de polisacárido fue evaluada para todos los serotipos

A partir de una solución concentrada de 100 mg/ml en acetonitrilo, CDAP (proporción CDAP/PS 0.75 mg/mg PS) fue agregado a la solución de polisacáridos 1.5 minutos después, se agregó trietilamina 0.2M para obtener el pH de activación específica La activación del polisacárido fue realizada a este pH durante 2 minutos a 25°C La proteína D (la cantidad depende de la proporción inicial PD/DS) fue agregada al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento fue realizada al pH específico durante 1 hr La reacción luego fue apagada con glicina durante 30 minutos a 25°C y durante la noche a 4°C

Los conjugados fueron purificados mediante filtración de gel utilizando una columna de filtración de gel Sephacril 500HR equilibrada con NaCl 0.2M

87

Se determinó el contenido de carbohidratos y proteínas de las fracciones eluidas. Los conjugados fueron agrupados y filtrados estérilmente sobre una membrana de esterilización de 0.22 µm. Las proporciones PS/proteína en las preparaciones conjugadas fueron determinadas.

Caracterización

Cada conjugado fue caracterizado y cumplió con las especificaciones descritas en la tabla 2. El contenido de polisacárido (µg/ml) fue medido mediante la prueba de Resorcinol y el contenido proteico (µg/ml) mediante la prueba de Lowry. La proporción PS/PD final (w/w) es determinada mediante la proporción de las concentraciones.

15 Contenido DMAP residual (ng/µg PS)

La activación del polisacárido con CDAP introduce un grupo de cianato en el polisacárido y DMAP (4-dimetilamino-piridina) es liberada. El contenido DMAP residual fue determinado por un ensayo específico desarrollado en SB.

20

Contenido de polisacáridos libres (%)

El contenido de polisacáridos libres de conjugados mantenidos a 4°C o almacenados 7 días a 37°C fue determinado sobre el sobrenadante obtenido después de incubación con anticuerpos alfa-PD y sulfato de amonio saturado, seguido por una centrifugación.

Se utilizó ELISA alfa-PS/alfa-PS para la cuantificación del polisacárido libre en el sobrenadante. La ausencia del conjugado también fue controlada mediante una ELISA alfa-PD/alfa-PS. La reducción de la cantidad de polisacárido libre resulta en una vacuna conjugada mejorada.

30

Antigenicidad:

La antigenicidad sobre los mismos conjugados fue analizada en una Elisa tipo sándwich en donde la captura y la
 5 supresión de anticuerpos fueron alfa-PS y alfa-PD respectivamente

Contenido Proteico libre (%):

El nivel de proteína D residual "libre" fue determinado
 10 utilizando un método con tratamiento SDS de la muestra El conjugado fue calentado 10 min a 100°C en presencia de SDS al 0.1% e inyectado sobre columna de filtración de gel SEC-HPLC (TSK 3000-PWXL) Como la proteína D es un dímero, hay un riesgo de sobre estimar el nivel de proteína D "libre"
 15 mediante disociación de la estructura con SDS

Tamaño Molecular (K_{av})

El tamaño molecular fue realizado sobre una columna de filtración de gel (TSK 5000-PWXL)
 20

Estabilidad

La estabilidad fue medida sobre una filtración de gel HPLC-SEC (TSK 6000-PWXL) para conjugados mantenidos a 4°C y almacenados durante 7 días a 37°C

25 La caracterización 11-valente es dada en la tabla 2
 Los conjugados proteicos pueden ser absorbidos sobre fosfato de aluminio y agrupados para formar la vacuna final

Conclusión:

30 Se han producido conjugados inmunogénicos, que han sido demostrados en ser componentes de una vacuna prometedora Las condiciones de CDAP optimizada para el mejor producto de

polisacárido de pneumococo conjugado de mejor calidad final
fue descubierto para cada una de las once valencias

Tabla 1
Condiciones específicas de activación/acoplamiento/extinción
de conjugados de PS S-pneumoniae-Proteína D

Serotipo	1	3	4	5	6B
Conc de PS (mg/ml)	2 0	3 0	2 0	7 5	5 4
Disolución PS	NaCl 2M	NaCl 2M	H2O	H2O	NaCl 2M
Conc PD (mg/ml)	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0
Proporción Inicial PS/PD (w/w)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Conc CDAP (mg/mg PS)	0 75	0 75	0 75	0 75	0 75
pH _a =pH _c =pH _q	9 0/9 0/9 0	9 0/9 0/9 0	9 0/9 0/9 0	9 0/9 0/9 0	9 0/9 0/9 0

Serotipo	9V	14	18C	19F	23F
Conc PS (mg/ml)	2 5	2 5	2 0	4 0	3 3
Disolución PS	NaCl 2M	NaCl 2M	H2O	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc PD(mg/ml)	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0
Proporción PS/PD Inicial (w/w)	1/0 75	1/0 75	1/1	1/0 5	1/1
Conc CDAP (mg/mg PS)	0 75	0 75	0 75	0 75	0 75
pH _a =pH _c =pH _q	8 5/8 5/9 0	9 0/9 0/9 0	9 0/9 0/9 0	10/9 5/9 0	9 0/9 0/9 0B

70
67

TABLA 2 Especificaciones de la vacuna PS-PD de pneumococo 11 valente (primeros números del código de lote indica serotipo)

5

Criterios	D01PDJ227	D03PDJ236	D4PDJ228	D5PDJ235	D6PDJ209	
Proporción PS/Prot (w/w)	1/0 66	1/1 09	1/0 86	1/0 86	1/0 69	
Contenido de polisacáridos libres (%) < 10%	1	1	7	9	0	
Contenido de proteínas libres (%) <15%	8	<1	19	21	9	
Contenido DMAP (ng/ug PS) <0 5 ng/ug PS)	0 2	0 6	0 4	1 2	0 3	
Tamaño molecular (K _{av})	018	0 13	0 12	0 11	0 13	
Estabilidad	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	
	D07PDJ225	D09PDJ222	D14PDJ202	D18PDJ221	D19PDJ206	D23PDJ21
Proporción PS/Prot (w/w)	1/0 58	1/0 80	1/0 68	1/0 62	1/0 45	1/0 74
Contenido de polisacáridos libres (%)	1	<1	<1	4	4	0

<10%						
Contenido de proteínas libres (%) <15%	8	0 3	3	21	10	12
Contenido de DMAP (ng/ug PS) <0 5 ng/ug PS	0 1	0 6	0 3	0 2	0 1	0 9
Tamaño molecular (K _{av})	0 14	0 14	0 17	0 10	0 12	0 12
Estabilidad	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio

Ejemplo 2 -impacto benéfico de la adición de una o más proteínas de pneumococo del invento +/- sobre la efectividad protectora de la vacuna polisacárida 11-valente PD-conjugada contra colonización pulmonar de pneumococo en ratones

Lecturas inmunológicas

Dosis ELISA de IgG de suero de proteína neumocócica específica

Inmunoplasmas Maxisorp Nunc son impregnadas durante 2 horas a 37°C con 100 ul/pozo de 2 µg/ml de proteína diluida en PBS Las placas fueron lavadas tres veces con NaCl al 0 9% amortiguador Tween-20 al 0 05% Luego, diluciones seriales dobles (en PBS/ Tween-20 al 0 05%, 100 µl por pozo) de una referencia sérica anti-proteica agregada como una curva estándar (comenzando en 670 ng/ml IgG) y muestras séricas

(comenzando en una dilución 1/10) son incubadas durante 30 minutos a 20°C bajo agitación. Después de lavado como se describió previamente, el IgG antiratón de cabra peroxidasa conjugado (Jackson) diluido 5000x en PBS/ Tween-20 al 0.05% se incubo (100 µl/pozo) durante 30 minutos a 20°C bajo agitación. Después de lavado, las placas son incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente con 100 µl/pozo de amortiguador de revelado (OPDA 0.4 mg/ml y H₂O₂ al 0.5% en amortiguador de citrato 100mM pH 4.5). El revelado es detenido agregando 50 µl/pozo HCl 1N. Las densidades ópticas son leídas a 490 y 620 nm utilizando un inmunolector Emax (Dispositivos Moleculares). El título de anticuerpos es calculado mediante el método matemático de 4 parámetros utilizando el software SoftMaxPro.

15

Ensayo de Opsonofagocitosis

El propósito de este ensayo es medir reproduciblemente la capacidad de opsonización de las muestras séricas de prueba contra los serotipos de *streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F o 23F utilizando un método adaptado del método estandarizado publicado del CDC (Steiner, Clinical y Diagnostic Laboratory Immunology 4: 415, 1997).

Este ensayo reproduce *in vitro* lo que ocurre *in vivo* cuando el mecanismo primario de eliminación invade el *streptococcus pneumoniae* o neumococos. Es decir la opsonización de los neumococos seguida por fagocitosis y luego eliminación. La "fagocitosis" es el proceso en el cual las células engullen material y lo encierran dentro de una vacuola (fagosoma) en el citoplasma. Los neumococos son eliminados cuando son fagocitados por fagocitos mamíferos saludables. La "opsonización" es el proceso mediante el cual

la fagocitosis es facilitada mediante la deposición de opsoninas, ej anticuerpo y complemento, sobre el antígeno

Se han reportado numerosos ensayos opsonofagocíticos en la literatura El método estandarizado del CDC fue probado en
5 un ambiente de multi-laboratorio (Steiner, ICAAC, Sep 16-20, 2000, Toronto) Este último ensayo fue adaptado a SB puesto que proporcionó una base para comparación con otros laboratorios, utiliza reactivos y controles que generalmente son disponibles, y expresa los resultados como el título
10 (dilución) de suero capaz de facilitar la eliminación de 50% de los neumococos viables, una unidad que es comúnmente utilizada para este tipo de ensayo En realidad, se mostró que el ensayo adaptado podría generar resultados que correspondieron bastante bien con otros 4 laboratorios
15 (Steiner, ICAAC, Sept 16-20, 2000, Toronto)

La célula fagocítica utilizada en el ensayo es la línea celular HL60, la cual se originó a partir de un individuo con leucemia promielocítica y se estableció como una línea celular continua por Collins en 1977 (Nature 270 347-9)
20 Esta línea celular esta compuesta de células hematopoyéticas no diferenciadas, es decir 85% células reticulares y promielocitos, 6% mielocitos, y 9% células diferenciadas Los compuestos polares pueden inducir la diferenciación de las células en al menos dos linajes diferentes N,N-
25 dimetilformamida induce diferenciación granulocítica la cual produce células tipo polimorfonucleares 44% mielocitos y metamielocitos y 53% PMNs segmentados y en banda)

En la versión A2 del ensayo, los sueros a ser probados son termo inactivados y 8 diluciones seriales dobles
30 comenzando en 1/4 son hechas en microplacas de 96-pozos en medio HBSS conteniendo BSA al 0.3% El volumen final de suero diluido en cada pozo es 25 µl El volumen final de suero

diluido en cada pozo es 25 µl

Cuatro volúmenes de células HL60 a 10^7 células /ml (5 o 6 días después de la diferenciación con formamida de dimetilo), dos volúmenes de bacteria de *S pneumoniae* (en la dilución apropiada) y 1 volumen de complemento de conejo bebé son mezclados inmediatamente antes de utilizar, y 25 µl de la mezcla es agregada a cada pozo de la microplaca de 96 pozos que contiene los sueros diluidos. Para los serotipos 1, y 6B, la cantidad de complemento es aumentada a una concentración final de 12.5%, dando la versión A3 del ensayo.

Después de dos horas de incubación a 37°C bajo agitación orbital, la placa es colocada sobre hielo con el objeto de detener la reacción de opsonofagocitosis.

Se hace un estimado de las unidades formadoras de colonia (CFU) en cada pozo mediante incubación durante la noche a 37°C. El "título opsónico" (OT) es definido como la dilución recíproca del suero capaz de reducir al menos en 50 por ciento el número de bacterias de *S pneumoniae* en los pozos (es decir, eliminación de 50%). El porcentaje de eliminación es calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de eliminación} = \frac{\text{pozos de control de CFU promedio} - \text{muestra CFU}}{\text{pozos de control de CFU promedio}} \times 100$$

Presentación intranasal de pneumococo en ratones OF1

Ratones hembra OF1 de siete semanas de edad son intranasalmente inoculados bajo anestesia con 5×10^5 CFU de serotipo *S pneumoniae* adaptado a ratón 2, 4 o 6B. Los pulmones son removidos 6 horas después de la presentación y homogeneizados (Ultramax, 24000 rpm, 4°C) en medio Todd Hewith Broth (THB, Gibco). Diluciones seriales por 10 de homogenatos pulmonares son sembradas durante la noche a 37°C.

72

sobre placas Petri conteniendo agar THB suplementado con extracto de almidón. La infección pulmonar por pneumococo es determinada como el número de CFU/ratón, expresado como promedio sopesado logarítmico. El límite de detección es 2×10^4 log CFU/ratón.

Ejemplo 2A Efecto de coadyuvante 3D-MPL sobre respuesta inmune anti-proteica

En el presente ejemplo, podemos evaluar el impacto de la acción coadyuvada sobre la respuesta inmune a la proteína del invento.

Grupos de 10 ratones hembra Balb/c de 6 semanas de edad son intramuscularmente inmunizados en los días, 0, 14 y 21 con 1 µg de proteína contenida en uno u otro A: AlPO₄ 100 µg, o B: AlPO₄ 100 µg + 5 µg de 3D-MPL (lípidos A de monofosforilo 3 de-O-acilado, suministrado por Ribi Immunochem). IgG ELISA es medido en sueros post-III.

Sin importar el antígeno, las mejores respuestas inmunes pueden ser mostradas como inducidas en animales vacunados con formulaciones suplementadas con 3D-MPL.

Ejemplo 2B Impacto benéfico de la adición de una proteína del invento +/- coadyuvante 3D-MPL sobre la efectividad protectora de la vacuna de polisacáridos 11-valente PD-conjugada contra colonización pulmonar de pneumococo en ratones OF1 intranasalmente estimulados con el serotipo 2, 4 o 6B

En el presente ejemplo, evaluamos la eficacia profiláctica de una vacuna que contiene el conjugado polisacárido-proteína D 11 valente, una proteína del invento.

y coadyuvantes AlPO₄ + 3D-MPL, en comparación con la formulación de conjugado polisacárido-proteína D 11 valente absorbida por AlPO₄

5 Grupos de 12 ratones hembra OF1 de 4 semanas de edad son inmunizados subcutáneamente en los días 0 y 14 con formulaciones que contienen A 50 µg de AlPO₄, B 0.1 µg de PS/serotipo de la vacuna de polisacárido 11 valente conjugada con PD + 50 µg de AlPO₄, o C 0.1 µg de PS/serotipo de la vacuna de polisacárido 11-valente conjugada con PD + 10 µg de la proteína del invento + 50 µg de AlPO₄ + 5 µg de 3D-MPL (suministras por Ribi Immunochem) La presentación es realizada en el día 21 como se describió anteriormente

15 Como se muestra por este método, una protección significativa es proporcionada por la vacuna conjugada de polisacárido 11-valente suplementada con la proteína del invento y complementada con AlPO₄ + MPL. Por el contrario, ninguna protección significativa es observada en animales inmunizados con el conjugado polisacárido 11-valente /formulación AlPO₄. Este resultado puede probar que la adición de la proteína del invento y el coadyuvante 3D-MPL aumenta la efectividad de la vacuna conjugada de polisacárido 11-valente contra neumonía.

25 **Ejemplo 2C, Correlatos inmunes de protección mostrada en el ejemplo 2B**

Con el objeto de establecer los correlatos inmunes de protección conferida en el ejemplo 2B, por la vacuna conjugada de polisacárido 11-valente suplementada con una proteína del invento y 3D-MPL, respuestas de anticuerpos serológicos pre-presentación al polisacárido 2, 4 o 6B, y la proteína del invento pueden ser medidas como se describió

74

anteriormente

Los títulos de anticuerpos son luego comparados con
números de colonias de bacterianas medidos en pulmones de los
correspondientes animales 6 horas pos-presentación R^2 son
5 calculados sobre regresiones lineales Log/log

R^2 calculado puede mostrar la ausencia de correlación
entre respuestas inmunes humorales y protección para ambos
antígenos Los títulos de anticuerpos anti-6B (o 2 o 4) no
son significativamente diferentes en los grupos inmunizados
10 con la vacuna conjugada 11-valente o con la misma vacuna
suplementada con la proteína del invento y 3D-MPL Por lo
tanto, la mejoría de protección vista con la formulación C no
solamente se debe a una mayor respuesta de anticuerpos al
polisacárido 6B (o 2 o 4)

15 Tomados juntos, los resultados pueden indicar que la
protección no es mediada por las respuestas inmunes humorales
solas, sino también por una inmunidad mediada por células por
el antígeno proteico (preferiblemente en presencia de 3D-
MPL) Esto puede dar soporte adicional a la adición de
20 antígenos proteicos y coadyuvantes potentes en la vacuna
conjugada de polisacáridos de pneumococo, a fin de coordinar
ambas ramas del sistema inmune para protección óptima

**Ejemplo 3 - La cooperación de ambas ramas del Sistema Inmune
25 en ratones activamente inmunizado con una proteína del
invento y pasivamente inmunizada con anticuerpos contra PS de
pneumococo**

**Ejemplo 3A -Encontrar la concentración de Protección de
30 Anticuerpos Polisacáridos (anti-PS) Anti-6B Administrado
Pasivamente (anti-PS) Contra Neumonía**

15

Método

Grupos de Vacunas Cuatro grupos de 16 ratones fueron pasivamente inmunizados (1 p) en el día 1 con 100 µl de antisueros anti-polisacáridos de rata no diluidos según los grupos detallados a continuación (total 64 ratones)

Grupo	Especificidad	Concentración IgG en Antisueros
G1	α-PS-6B	5 µg/ml
G2	α-PS-6B	2 µg/ml
G3	α-PS-6B	0 75 µg/ml
G4	Control	0 µg/ml

Animales 64 ratones macho CD-1 de Charles River, Canadá, con peso aproximado de 35g (aproximadamente 10 semanas de edad)

Anestesia Los ratones fueron anestesiados con isofluorano (3%) más O2 (1 L/min)

Organismo N1387 de *S pneumoniae* (serotipo 6) fue cosechado a partir de placas de agar de soya triptícase (TSA) suplementadas con sangre equina al 5% y suspendidas en 6 ml de PBS Inmediatamente antes de la infección, 1 ml de suspensión bacteriana fue diluida en 9 ml de agar de nutriente fundido enfriado (BBL) y mantenida a 41°C Los ratones recibieron aproximadamente 6 0 log 10 cfu/ratón en un volumen 50 µl

Infección El día 0 los ratones fueron anestesiados como se describió anteriormente e infectados N1387 de *S pneumoniae* (50 µl de suspensión bacteriana enfriada) por instilación intra-bronquial vía intubación intra-traqueal no

quirúrgica Este método fue descrito por Woodnut y Berry
(Antimicrob Ag Chemotherap 43 29 (1999))

Muestras El día 3 después de la infección, 8
ratones/grupo fueron sacrificados por sobredosis de CO2 y los
pulmones fueron cortados y homogenizados en 1 ml de PBS Las
diluciones seriales por 10 fueron preparadas en PBS para
enumerar números bacterianos viables Las muestras fueron
inoculadas (20 µl) en triplicado sobre placas TSA
suplementadas con sangre equina al 5% e incubadas durante la
noche a 37°C antes de evaluación Grupos adicionales de
ratones fueron sacrificados el día 7 y muestreados como
antes

Resultados

Conc IgG (ug/ml) en sueros de ratas	Números bacterianos (log 10 cfu/pulmones) en días post infección	
	3	8
5	6 7 ± 0 7 (1/7)	7 2±0 7 (5/8)
2	6 5 ± 0 7 (1/7)	6 9 ± 1 8 (4/7)
0 75	7 7 ± 0 5 (5/8)	4 8 ± 1 4 (2/8)
0	6 7 ± 1 5 (3/6)	6 3 ± 1 5 (3/9)

Las Figuras en paréntesis son números de animales que
murieron antes del momento de la muestra

Conclusión En general, no hubo diferencia significativa en
números bacterianos aislados de cualquiera de los grupos de
tratamiento Esto indica que se proporcionó una protección no
medible por el anticuerpo anti-polisacárido en

80
77

concentraciones de hasta e incluyendo 5 µg /ml

Esto es similar a lo observado en algunos ensayos clínicos humanos, es decir, el anticuerpo anti-polisacárido es insuficiente para proteger contra neumonía de pneumococo en algunas poblaciones

Ejemplo 3B - Determinar la protección a partir de neumonía proporcionada por la administración activa de una proteína del invento con o sin coadyuvante, y sinergia con anticuerpo anti-PS sub-óptimo

Método

Animales 128 ratones CD-1 macho (6 semanas de edad en el momento de inmunización, 10 semanas de edad en el momento de infección) de Charles River, St Constant, Quebec, Canadá Los animales pesaron aproximadamente 20 g a las 6 semanas y 38g a las 10 semanas

Inmunizaciones Seis grupos de 16 ratones son inmunizados mediante inyección subcutánea en los días 22 y 14 con 100 µl de la vacuna como se define más adelante (128 ratones en total) 3D-MPL se obtuvo en Ribi/Corixa

El día 1, grupos específicos (ver Tabla a continuación) son inmunizados (1 p 100 µl) pasivamente con una concentración de 4 26 µg /ml (4 ml de 5 µg /ml + 1 3 ml de 2 µg /ml) anticuerpo anti-polisacárido de ratón

Grupo	Volumen de Inyección Activo	Vacuna administrada en los días 22, 14 (dosificación µg)	Volumen de Inyección Pasivo	IgG Pasivo (día- 1)
1-1	100 ul s c	proteína/AlPO4		Ninguno

81/78

		(10/50)		
1-2	100 ul s c	proteína/MPL/AlPO4 (10/5/50)		Ninguno
1-3	100 ul s c	proteína/AlPO4 (10/5/50)	100 ul i p	Alfa-PS
1-4	100 ul s c	proteína/MPL/AlPO4 (10/5/50)	100 ul i p	Alfa-PS
1-5	100 ul s c	MPL/AlPO4 (5/50)	100 ul I p	Alfa-PS
1-6	100 ul s c	MPL/AlPO4 (5/50)		Ninguno

Infección El día 0, los ratones son anestesiados (isofluorano al 3% más 1 L/min O2) Inóculos bacterianos son preparadas mediante cultivo de N1387 de *S pneumoniae* (serotipo 6) a partir de placas de agar de soya tripticasa (TSA) suplementadas con sangre equina al 5% y suspendidos en 6 ml de PBS Una dilución por 10 (1 ml más 9 ml) es preparada en agar nutriente fundido enfriado (mantenido a 41°C)

inmediatamente antes de la infección Los ratones son infectados mediante instilación intra-bronquial vía intubación intra-traqueal y recibieron aproximadamente 6 0 log10 cfu/ratón en un volumen de 50 µl Este método fue descrito por Woodnut y Berry (Antimicrob Ag Chemotherap 43 29 (1999))

Muestras En 72 post infección, 8 ratones/grupo son sacrificados por sobredosis de CO2 y los pulmones son cortados y homogenizados en 1 ml de PBS Diluciones seriales por 10 son preparadas en PBS para enumerar números

bacterianos viables Las muestras son inoculadas (20 µl) en

82
79

triplicado sobre placas TSA suplementadas con sangre equina al 5% e incubadas durante la noche a 37°C antes de evaluación Grupos adicionales de ratones son sacrificados el día 8 después de la infección y las muestras como antes

5

Análisis de Datos

La medida de resultado para comparación de tratamiento es el numero de bacterias en los pulmones el día 3 y 7 después de la infección Los resultados pueden ser

10 presentados como medias de grupo con desviaciones estándar El análisis estadístico debe ser realizado utilizando la prueba t de Students donde un valor P de <0.05 es considerado significativo

15 Como se demostró anteriormente, el anticuerpo anti-polisacárido sólo (Grupo 1-5) puede ser mostrado por no proporcionar protección contra crecimiento de pneumococos en el pulmón La proteína de pneumococo complementada con AlPO₄ (Grupo 1-1) puede no conferir protección alguna, pero lo hará en una mejor medida cuando la proteína es combinada con 3D-MPL (Grupo 1-2)

20 La mayoría de protección significativa puede ser observada en grupos con ambos anticuerpo anti-polisacárido y proteínas, particularmente en el grupo que tiene todos los tres elementos, proteína, 3D-MPL y anticuerpo anti-polisacárido administrado de forma pasiva (Grupo 1-4) Esta

25 conclusión también puede ser soportada por la tasa de mortalidad Los grupos 1-3 y particularmente 1-4 tendrán más pocas muertes en comparación con los demás grupos

30 Conclusión

Como el experimento es hecho con animales inmunizados de manera pasiva, el efecto sinérgico de también inmunizar

activamente con proteína (+/- MPL) no se puede deber a un aumento en el nivel de anticuerpos contra el antígeno polisacárido

5 Protección significativa contra neumonía por pneumococo puede ser observada en grupos inmunizados con ambos proteína más anticuerpo anti- polisacárido administrado de manera fácil, particularmente si 3D-MPL también está presente, indicando la sinergia de esta combinación

10 Si la inmunización anti-polisacárido es llevada a cabo de manera activa (preferiblemente con polisacárido conjugado), este efecto será aún más marcado, como quiera que el efecto de memoria de células-B, y los niveles constantes de anticuerpo anti-PS a través de todo el experimento contribuirán a la cooperación de la respuesta inmune

15

Ejemplo 4 - método para determinar sinergia mediante correlato de protección

20 El mecanismo de origen de protección que el cuerpo humano utiliza para eliminar pneumococo infeccioso es la opsonofagocitosis mediada por anticuerpos (Bruyn Clin Infect Dis 14 251 (1992)) Mientras que varios métodos ELISA han sido utilizados para medir la concentración de anticuerpos para polisacáridos capsulares como un correlato
25 de protección, se ha vuelto aparente que el ensayo de opsonofagocitosis *in vitro* es un correlato mejor de protección (Musher, J Infect Dis 182 158 (2000))

30 Las proteínas de pneumococo del invento proporcionan protección contra infección de pneumococo mediante mecanismos que son diferentes de la opsonofagocitosis mediada por anticuerpos En el ejemplo 2, la inmunización activa con ambos el conjugado y la proteína puede mostrar un efecto

84
87

sinérgico, el cual no puede ser explicado por las diferencias de concentración de anticuerpos puesto que éstas son iguales en ambos grupos. Por lo tanto la protección residual que puede ser preservada debe venir de un efecto sinérgico. De manera similar, puesto que el anticuerpo es agregado de manera pasiva, la misma conclusión puede ser alcanzada en el ejemplo 3.

En muchos casos, las proteínas de pneumococo del invento están asociadas a superficie, y se espera proporcionen alguna actividad opsonica por si mismas. En este caso es posible distinguir el mecanismo de protección a través de una medida cuantitativa de la capacidad de opsonización de la proteína anti-de pneumococo, la cual puede ser utilizada para estimar la contribución relativa de actividad opsonica a otros mecanismos sinérgicos de protección.

En el modelo de colonización pulmonar de ratón, la protección relativa de cada vacuna puede ser estimada a partir de la depuración de bacterias de los pulmones. O alternativamente, la eficacia de la vacuna puede ser estimada a partir de tasas de caso, como normalmente se determinó para vacunas.

% Protección = $(\text{control CFU/Pulmón} - \text{Vacuna CFU/pulmón}) / (\text{Control CFU/Pulmón})$

% Eficacia = $(\text{Control Casos} - \text{Vacuna Casos}) / (\text{Control Casos})$

Determinar la porción de la protección o eficacia que se origina a partir del efecto sinérgico, es cuestión de determinar cuál porción de la eficacia sería esperada con base en la proporción de los títulos opsonicos.

En el ejemplo 3 anterior, el % de protección mediante la combinación se debe a la sinergia entre los componentes.

85
82

proteína/anticuerpo puesto que ninguno ni la proteína ni el anticuerpo anti polisacárido solos pueden suministrar tanta protección por si mismos

Es posible estimar la cantidad de protección del efecto sinérgico sobre la base de la actividad opsónica relativa Si la actividad opsónica proporcionada por un anticuerpo polisacárido anticapsular es X, y la actividad opsónica proporcionada por un anticuerpo proteico de antipneumococo es Y, entonces la actividad opsónica total puede ser mostrada como $X + Y$, y la porción relativa de la actividad opsónica de la proteína sería $Y/X+Y$ Esto se compara a la eficacia protectora relativa de una vacuna, donde la porción de anti-polisacárido de la vacuna proporciona una eficacia protectora de $A\%$, y la eficacia protectora de la vacuna del polisacárido más la proteína es $B\%$ La eficacia adicional que no puede ser explicada por la actividad opsónica entonces es estimada como actividad protectora residual (sinergia) = $B\% - A\% - B\% \cdot (Y/X+Y)$

Este ejemplo no pretende limitar las formas de estimar el efecto de sinergia Una vez que otros correlatos de protección han sido identificados, éstos pueden ser utilizados para estimar éste efecto sinérgico

Todas las publicaciones, incluyendo pero sin limitar a patentes y solicitudes de patentes, citadas en ésta especificación son incorporadas en la presente como referencia como si cada publicación individual fuera específicamente o individualmente indicada como incorporada como referencia en la presente como considerada completamente divulgada

30

86
83

Reivindicaciones

- 1 Una composición inmunogénica que comprende por lo menos un antígeno polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* y por lo menos un antígeno proteico de *Streptococcus pneumoniae*
- 5 seleccionados entre PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133, o un equivalente inmunológicamente funcional de los mismos
- 2 La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en
10 donde el antígeno polisacárido es presentado en forma de un conjugado portador polisacárido-proteína
- 3 La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en
15 donde la proteína portadora es seleccionada a partir del grupo que consiste de toxoide de Difteria, toxoide de Tetano, CRM197, Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), derivado proteico de Tuberculina, y proteína D de *H influenzae*
- 4 Una composición inmunogénica tal como se reivindica en
20 cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde la vacuna comprende por lo menos cuatro antígenos polisacáridos neumocócicos de diferentes serotipos
- 5 Una composición inmunogénica tal como se reivindica en
25 la presente la cual adicionalmente comprende un co-adyuvante
- 6 Una composición inmunogénica tal como se reivindica en
la reivindicación 5, en donde el co-adyuvante comprende una sal de aluminio
- 30 7 Una composición inmunogénica tal como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el co-adyuvante es un inductor

82
84

preferencial de una respuesta TH1

- 8/ Una composición inmunogénica tal como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el co-adyuvante comprende por lo menos uno de los siguientes 3D-MPL, un inmunoestimulante de saponina, o un oligonucleótido CpG inmunoestimulatorio
- 9/ Una composición inmunogénica tal como se reivindica en la reivindicación 8, en donde el co-adyuvante comprende un vehículo seleccionado del grupo que comprende una emulsión de aceite en agua, liposomas, y una sal de aluminio
- 10 Una composición inmunogénica tal como se reivindica en la presente para uso como medicamento
- 11/ Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9
- 12/ Un método para prevenir o mejorar una infección por *S pneumoniae* en un paciente sobre los 55 años de edad, el cual comprende administrar una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un polisacárido de *S pneumoniae* y por lo menos una proteína de *S pneumoniae* seleccionada entre el grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130, y Sp133, y de manera opcional, un co-adyuvante inductor de TH1
- 13/ El uso de un antígeno polisacárido neumocócico en combinación con un antígeno proteico de *S pneumoniae* seleccionado entre el grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130, y Sp133, y de manera opcional, un co-adyuvante inductor de TH1,

85

en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de neumonía en pacientes mayores de 55 años

- 14 El uso de un antígeno polisacárido neumocócico en
5 combinación con un antígeno proteico de *S pneumoniae*
seleccionado entre el grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB,
PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130, y
Sp133, y de manera opcional, un co-adyuvante inductor de TH1,
10 tratamiento de otitis media en infantes o bebés caminadores

- 15 Un método para fabricar una composición inmunogénica tal
como se reivindica en la presente, el cual comprende los
pasos de

- 15 seleccionar uno o más antígeno(s) polisacáridos
neumocócicos,
seleccionar uno o más antígeno(s) proteicos
neumocócicos a partir del grupo que consiste de PhtA, PhtD,
PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128,
20 Sp130, y Sp133, y
mezclar dichos antígenos polisacáridos y proteicos con
un excipiente adecuado

- 16 Un método de prevenir o mejorar Otitis media en bebés,
25 el cual comprende administrar a dicho bebé una cantidad
efectiva de una vacuna que comprende un polisacárido de *S*
pneumoniae y una proteína de *S pneumoniae* seleccionada entre
el grupo que consiste de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB,
LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130, y Sp133, y de manera
30 opcional un co-adyuvante inductor de TH1

NT

86

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

El presente invento se relaciona con el área de las vacunas de antígenos polisacáridos bacterianos. Particularmente, el
5 presente invento se relaciona con vacunas que comprenden un antígeno polisacárido neumocócico, típicamente un antígeno conjugado polisacárido neumocócico a partir de *S pneumoniae* seleccionado a partir de PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130, y Sp133, y de manera
10 opcional un co-adyuvante inductor de TH1

PATENT COOPERATION TREATY

23
94
87

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To LUBIENSKI Michael John GLAXOSMITHKLINE Corporate Intellectual Property 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE	Rece 19 DEC 2002 JAS MT IPM N PTT	NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)
		Date of mailing <i>(day/month/year)</i> 16 12 2002

Applicant's or agent's file reference MJL/B45240		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No PCT/EP01/10588	International filing date (day/month/year) 12/09/2001	Priority date (day/month/year) 15/09/2000	
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S A et al			

- 1 The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application
- 2 A copy of the report and its annexes if any is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices
- 3 Where required by any of the elected Offices the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices

4 REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301)

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices see Volume II of the PCT Applicant's Guide

For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the international preliminary examination report is based (see Articles 27(5), 33(5)). Additional criteria may include e.g. exemptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims

Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2369 0 Tlx 523656 epmu d Fax +49 89 2369 4485	Authorized officer Cleere, C Tel +49 89 2369-7713	
---	--	---

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MJL/B45240	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No PCT/EP01/10568	International filing date (day/month/year) 12/09/2001	Priority date (day/month/year) 15/09/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/09		
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S A et al		

1 This International preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2 This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions under the PCT)

These annexes consist of a total of sheets

3 This report contains indications relating to the following items

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty Inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty Inventive step or industrial applicability citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21/03/2002	Date of completion of this report 18.12.2002
Name and mailing address of the international preliminary examining authority  European Patent Office D-80286 Munich Tel: +49 89 2369 0 Tlx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2369 4465	Authorized officer BROCHADO GARGANTA, M Telephone No. +49 89 2369 8935 

89

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No PCT/EP01/10568

I Basis of the report

- 1 With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70 16 and 70 17)*):
- Description, pages**

1-38 as originally filed

Claims, No

1-16 as originally filed

- 2 With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23 1(b))
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48 3(b))
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55 2 and/or 55 3)

- 3 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing

- ☐ contained in the international application in written form
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

- 4 The amendments have resulted in the cancellation of

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims Nos
- ☐ the drawings, sheets

- 5 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c))

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No PCT/EP01/10568

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report)

6 Additional observations, if necessary

III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1 The questions whether the claimed invention appears to be novel to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos 12, 16

because

☒ the said international application, or the said claims Nos 12, 16, with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*)
see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*)

☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed

☐ no international search report has been established for the said claims Nos

2 A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard

V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims 1-16
	No	Claims
Inventive step (IS)	Yes	Claims
	No	Claims 1-16
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims 1-11, 13-15

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No **PCT/EP01/10568**

No Claims

**2 Citations and explanations
see separate sheet**

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 1 Claims 12 and 16 are directed to a method of treatment of the human/animal body. They relate therefore to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67 1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

- 1 Reference is made to the following documents

- (D1) BRILES D E ET AL. 'The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by Streptococcus pneumoniae' VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC GUILDFORD, GB, vol 19, 8 December 2000 (2000-12-08), pages S87-S95
- (D2) WO 90 06951 A (PATON JAMES CLELAND, HANSMAN DAVID JOHN (AU), MITCHELL TIMOTHY JOH) 28 June 1990 (1990-06-28)
- (D3) WO 99 03884 A (MINETTI CONCEICAO, LIANG SHU MEI (US), MICHON FRANCIS (US), TAI JO) 28 January 1999 (1999-01-28)
- (D4) WO 98 18930 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC, CHOI GIL H (US), HROMOCKYJ ALEX (US), J) 7 May 1998 (1998-05-07) cited in the application

- 2 D1, cited in the International Search Report as intermediate document, would be considered as a relevant prior art document in a possible regional phase, if the date of priority is not validly claimed for the relevant parts of the present application

3 Novelty

The subject-matter of claim 1, relating to an immunogenic composition, is new in the sense of Article 33(2) PCT, because a composition having a polysaccharide antigen and one of the claimed protein antigens, is not disclosed in the prior art. Therefore, dependent claims 2-10 are also considered to be novel (Article 33(2) PCT)

For the same reasons, claims 11-16, relating to a vaccine comprising the claimed composition, to a method of preventing or ameliorating *Streptococcus pneumoniae* infection in a patient over 55 years by administering the vaccine, to the use of polysaccharide antigens in combination with protein antigens in the manufacture of a medicament, to a method of making the composition and to a method of preventing or ameliorating Otitis media in Infants, are also considered to be novel (Article 33(2) PCT)

4 Inventive step

- 4.1 D2 discloses a vaccine comprising capsular **polysaccharide material** from ***Streptococcus pneumoniae*** conjugated with a **protein carrier** and non-conjugated protein material, wherein **the protein carrier is an altered pneumolysin** (see claim 9)

D3 refers to a vaccine comprising a polypeptide conjugated to a bacterial polysaccharide, wherein the peptide is an **altered pneumolysin** and the polysaccharide is from ***Streptococcus pneumoniae*** (see claims 1 and 28-30)

The difference between the subject-matter of claims 1 and 11 and the disclosure in D2 or D3 is the fact that the peptide is not an altered pneumolysin but selected from the group PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, **Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133**

98
024

D4 refers to **Streptococcus pneumoniae** antigens and vaccines, wherein several antigenic polypeptides are disclosed, as for example Sp101 and Sp125 (see abstract and table I)

Further antigenic polypeptides of **Streptococcus pneumoniae** are well known in the art. It is therefore considered as within the capabilities of the skilled person to combine the teachings of D2 and D4 or D3 and D4 and arrive in this way to the features of claims 1 and 11 without for that needing to perform an inventive step. Thus, claims 1 and 11 do not involve an inventive step as required by Article 33(3) PCT.

Claims 2-10 do not contain any additional features which in combination with the features of claim 1, meet the requirements of the PCT in respect of inventive step (Article 33(3) PCT). Their additional features are also known from D2 (see claims 7-15 and pages 6-9) and D3 (see claims 2830 and Examples).

4.2 The use of a pneumococcal polysaccharide antigen in combination with an altered pneumolysin in the manufacture of a medicament for the treatment of pneumonia, methods of treatment of pneumonia and otitis by administering said medicament, and methods of making an immunogenic composition having the altered pneumolysin, are disclosed in D2 and D3 (see respectively, claims 19-23 and pages 3-10, and claims 33-34 and Examples). Considering the reasoning given in 4.1, it is considered within the capabilities of the skilled person to consider the use of a different polypeptide, by selecting it from a group of known peptides, and arrive to the features of claims 12-16. Thus, claims 12-16 are not considered to involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

5 For the assessment of the present claims 12 and 16 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.