

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 436**

21 Número de solicitud: 201030822

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

28.05.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.09.2012

Fecha de la concesión:

29.07.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.08.2013

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)
 AVDA. DE LA CONSTITUCION ,18
 41071 SEVILLA (Sevilla) ES y
 UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MCCONNELL, Michael y
 PACHON, Jeronimo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **VACUNA FRENTE A ACINETOBACTER**

57 Resumen:

Vacuna frente a Acinetobacter.

La invención se refiere a una composición que comprende células inactivadas del género Acinetobacter y/o proteínas aisladas de las mismas y a su uso para la elaboración de un medicamento, preferiblemente una vacuna, para la prevención de enfermedades producidas por un organismo del género Acinetobacter. Estas composiciones generan una respuesta inmune, que permite proteger a pacientes frente a enfermedades producidas por organismos de este género, las cuales resultan muy comunes en pacientes ingresados en hospitales.

ES 2 387 436 B1

DESCRIPCIÓN

VACUNA FRENTE A ACINETOBACTER

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología y la inmunología. Específicamente, se refiere a una composición que comprende
5 células inactivadas del género *Acinetobacter* y/o proteínas aisladas de las mismas y al uso de esta composición como medicamento para la prevención de enfermedades provocadas por organismos de este género.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

El organismo *Acinetobacter baumannii* es un bacilo gram negativo aerobio y es agente causal de multitud de enfermedades nosocomiales. El aumento de las enfermedades nosocomiales en la actualidad se debe a la aparición de cepas de este organismo tanto multirresistentes como panresistentes a antibióticos en
15 hospitales. Debido a la aparición de estas cepas, se hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de estas enfermedades.

Las infecciones por *A. baumannii* cursan con diferentes síntomas, y causan diversos tipos de infección en función de la vía de entrada en el huésped. La
20 vía de entrada más común son las vías respiratorias, lo que provoca neumonías en multitud de casos. Este tipo de infección presenta un elevado riesgo de muerte. Estas neumonías suponen un 6,9% de las neumonías de pacientes ingresados en la UCI en Estados Unidos (Gaynes *et al.* 2005, *Clin Infect Dis*, 41:848-854), un 9,6% en América Latina (Gales *et al.* 2002, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 44:301-311), un 27% en
25 Turquía (Meric *et al.* 2005, *Japanese journal of infectious diseases*, 58:297-302) y un 35% en India (Agarwal *et al.* 2006, *The journal of infection*, 53:98-105). La tasa de muerte asociada a neumonías nosocomiales generadas por *A. baumannii* es elevada y varía entre el 35% y el 70% (Fagon *et al.* 1996, *Clin Infect Dis*, 23:538-542; Fagon *et al.* 1993, *The American journal of medicine*, 94:281-288; Garnacho-Montero *et al.* 2005, *Intensive care medicine*, 31:649-655). Además de estas neumonías nosocomiales, este organismo genera

también neumonías adquiridas en la comunidad (*Community-acquired pneumonia* o CAP) las cuales presentan una alta mortalidad.

5 Este organismo también genera bacteriemias, las cuales suponen un 6,2% de las bacteriemias de pacientes de UCI en Estados Unidos. La bacteriemia en estos casos produce entre un 20% y un 60% de mortalidad (Wisplinghoff *et al.* 2000, *Clin Infect Dis*, 31:690-697). En España *A. baumannii* es el responsable del 27% de las bacteriemias causadas por bacterias gram-negativas (Cisneros *et al.* 1996, *Clin Infect Dis*, 22:1026-1032).

10

Además, *A. baumannii* en España supone la tercera causa más común de meningitis (Moreno *et al.* 1990, *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 13:281-286), y la segunda causa de infecciones por quemaduras (Frame *et al.* 1992, *The journal of burn care & rehabilitation*, 13:281-286).

15

Todo lo anterior muestra la necesidad de encontrar tratamientos para las infecciones causadas por *A. baumannii* para evitar todas estas complicaciones.

20 El tratamiento habitual hasta el momento era el uso de antibióticos que actuasen frente a estas bacterias. El problema con estos tratamientos surgió cuando en las dos últimas décadas aparecieron cepas resistentes a los mismos. De esta forma se observa un elevado número de aislados de la bacteria que presentan resistencias a diversos antibióticos, como por ejemplo, a la ceftazidima (entre un 24% y un 67%), a amikacina (entre el 3% y el 20%), o a imipenem (hasta el 20%) (Gaynes *et al.* 2005, *Clin Infect Dis*, 41:848-854).
25 También se ha observado que un 40% de cepas aisladas son resistentes a ciprofloxacino, un 30% a levofloxacino, un 26% a gentamicina y un 22% a cefepima (Rhombert *et al.* 2007, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59:425-435). Todo esto ha llevado a la existencia de un elevado
30 número de cepas multirresistentes a varios antibióticos con excepción de la colistina. En los últimos años también se ha observado la emergencia de cepas panresistentes, las cuales presentan asimismo resistencias frente a este

antibiótico (Souli *et al.* 2006, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50:3166-3169).

Debido a esta capacidad de adquirir resistencias por parte de *A. baumannii*, y de adaptarse a los nuevos antibióticos, se han desarrollado nuevas estrategias para tratar estas enfermedades. Una de ellas es el desarrollo de nuevas moléculas que presentan actividad antimicrobiana. Aunque, debido a la capacidad de *A. baumannii* de adquirir rápidamente resistencia a antibióticos, dicha estrategia podría tener un carácter temporal, haciendo necesario llevar a cabo un abordaje diferente al cabo de un tiempo.

10

Existe, por tanto, la necesidad de buscar nuevas formas de impedir o tratar las infecciones causadas por *A. baumannii*, debido a la gran cantidad de enfermedades que produce y a la alta tasa de morbilidad de las mismas, ya que los tratamientos actuales presentan paulatinamente una pérdida de su eficacia.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición que comprende células inactivadas del género *Acinetobacter* y/o proteínas aisladas de las mismas y al uso de esta composición como medicamento para la prevención de enfermedades provocadas por organismos de este género.

20

Los autores de la presente invención demuestran que células inactivadas de *Acinetobacter baumannii*, al ser inoculadas en diversos individuos, provocan la inmunización de éstos, los cuales se encuentran así protegidos frente a posteriores infecciones causadas por dicha bacteria, lo que demuestra la utilidad del uso de estas células como vacunas profilácticas frente a infecciones provocadas por *A. baumannii*.

25

30

Por todo esto, un aspecto de la invención se refiere a células inactivadas del género *Acinetobacter*, de ahora en adelante "células de la invención" o "células

inactivadas de la invención”. Dentro de este género, la especie que presenta una mayor capacidad patogénica es la especie *Acinetobacter baumannii*. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención las células inactivadas del género *Acinetobacter* son de la especie *Acinetobacter*
5 *baumannii*.

Se entiende por “células del género *Acinetobacter*” en la presente invención aquellas células de organismos pertenecientes al superreino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales*, familia
10 *Moraxellaceae*, y género *Acinetobacter*.

En la presente invención se entiende por “células de la especie *Acinetobacter baumannii*” aquellas células de organismos pertenecientes al superreino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden
15 *Pseudomonadales*, familia *Moraxellaceae*, género *Acinetobacter* y especie *Acinetobacter baumannii*.

Se entiende por “célula inactivada” en la presente invención aquella célula que no presenta capacidad de replicación pero que conserva la capacidad
20 inmunogénica. Las células de la presente invención son inactivadas previamente a su inoculación para evitar su replicación en el organismo hospedador, y por lo tanto, para prevenir infecciones generadas a partir de su aplicación. La inactivación de las células de la invención puede llevarse a cabo mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica como por
25 ejemplo, aunque sin limitarse, mediante adsorción, calor, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, ultrasonidos, fenol, formol, formaldehído, cristal violeta, gliceraldehído, óxido de etileno, propiolactona, etilenimina, bromoetilenimina o formalina. En una realización preferida las células de la invención se inactivan mediante la adición de formalina. En otra realización preferida las células de la
30 invención son de la especie *Acinetobacter baumannii* y se inactivan mediante la adición de formalina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición (de ahora en adelante “composición de la invención”) que comprende uno de los elementos seleccionados de la lista que comprende:

- 5 a) células inactivadas de la invención,
 b) proteínas aisladas de células inactivadas de la invención,
o una combinación de (a) y de (b).

Se entiende por “proteínas aisladas de células inactivadas de la invención” una
10 o un conjunto de proteínas que se pueden obtener de las células de la invención mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Las proteínas que presentan un mayor potencial para la generación de una respuesta inmune son las proteínas de la membrana celular, ya que son éstas las que pueden ser reconocidas por los anticuerpos generados en el huésped
15 en caso de infección bacteriana por ser las proteínas expuestas en la superficie de la bacteria. Por todo ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención las proteínas aisladas de (b) son proteínas de la membrana celular.

En otra realización preferida, estas proteínas de (b) se obtienen mediante un
20 método que comprende:

- i) disociar las proteínas de la membrana celular mediante la adición de un detergente a las células inactivadas de la invención, y
 ii) precipitar las proteínas disociadas en el paso (i).
25

Este método presenta como ventaja frente a otros métodos de obtención de proteínas, que el detergente, además de disociar las membranas, forma micelas las cuales engloban las endotoxinas de *Acinetobacter*, y permiten su eliminación. Esto permite que la mezcla proteica obtenida esté más libre de
30 contaminantes. En los ejemplos de la presente invención se demuestra cómo mediante este método se recuperan todas las proteínas presentes en las células de *Acinetobacter* excepto una proteína de 36 KDa identificada como

5 proteína A de la membrana externa de *Acinetobacter baumannii* (AbOmpA; número de acceso en UniProtKB: Q6RYW5). Dicha proteína se encuentra unida de forma natural a las endotoxinas de *A. baumannii*. Por ello, la eliminación de dicha proteína conlleva la eliminación de las endotoxinas de dicho organismo.

Por ello, una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende uno de los elementos seleccionados de la lista que comprende:

- 10 a) células inactivadas de la invención,
 b) proteínas aisladas de células inactivadas de la invención,
 o una combinación de (a) y de (b), donde las proteínas de (b) se obtienen mediante un método que comprende:
- 15 i) disociar las proteínas de la membrana celular mediante la adición de un detergente a las células inactivadas de la invención, y
 ii) precipitar las proteínas disociadas en el paso (i).

20 Existen multitud de detergentes que pueden ser utilizados para disociar las proteínas de membrana. Entre estos se encuentran tanto los iónicos como los no iónicos y los anfóteros, como por ejemplo aunque sin limitarse, Triton X-100, Triton X-114, dodecilsulfato sódico (SDS), octilglucósido, octiltioglucoído, maltósido, cetiltrimetilamonio (CTAB), sulfobatina 3-12, o 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS), NP-40, el deoxicolato de sodio, DOC, Brij o Hecameg. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el detergente utilizado en el paso (i) es SDS o Tritón.

25

La precipitación de proteínas se puede llevar a cabo por múltiples métodos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, aunque sin limitarse, por la adición de sulfato de amonio, ácido tricloroacético, etanol, acetona, ácido 30 tricloroacético y acetona, o metanol y cloroformo. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la precipitación de las proteínas en el paso (ii) se realiza mediante la adición de cloroformo y metanol. En una realización más

preferida de este aspecto de la invención, el detergente utilizado en el paso (i) es SDS o Tritón, y la precipitación de las proteínas en el paso (ii) se realiza mediante la adición de cloroformo y metanol.

- 5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende además otro principio activo. En una realización más preferida de este aspecto de la invención la composición de la invención comprende además un adyuvante.
- 10 En esta memoria, el término "adyuvante" se refiere a un agente, que no posea un efecto antigénico por sí mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Existen multitud de adyuvantes como por ejemplo, aunque sin limitarse, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, agonistas de los receptores tipo toll, citoquinas, escualeno, adyuvante
- 15 incompleto de Freund o adyuvante completo de Freund. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el adyuvante se selecciona de la lista que comprende: fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, agonistas de los receptores tipo toll, citoquinas, escualeno, adyuvante incompleto de Freund o adyuvante completo de Freund. En una realización aun más preferida de este
- 20 aspecto de la invención, el adyuvante es fosfato de aluminio.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento. Otro aspecto de la invención

25 se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades producidas por organismos del género *Acinetobacter*, o alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento o

30 prevención de enfermedades producidas por organismos del género *Acinetobacter*. En una realización preferida de este aspecto de la invención los organismos del género *Acinetobacter* son de la especie *Acinetobacter baumannii*.

Se entiende por "enfermedad producida por organismos del género *Acinetobacter*" aquellas enfermedades en las que el agente causal de la patología es del género *Acinetobacter*, o alguno de sus productos de metabolismo. El género *Acinetobacter* produce diversas de patologías, como por ejemplo aunque sin limitarse, bacteriemia, meningitis, infección del tracto urinario, infecciones de la piel y tejidos blandos, infección del lecho quirúrgico o neumonía. Por todo ello, en una realización más preferida, la enfermedad producida por organismos del género *Acinetobacter* se selecciona de la lista que comprende: bacteriemia, meningitis, infección del tracto urinario, infecciones de la piel y tejidos blandos, infección del lecho quirúrgico o neumonía.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la composición de la invención. Esta composición de la invención comprende células inactivadas del género *Acinetobacter* y/o proteínas de las mismas en una cantidad terapéuticamente efectiva, que es capaz de inducir una respuesta inmune en el organismo al que le son administradas frente a un organismo del género *Acinetobacter*. El término "medicamento" incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de células inactivadas de la invención, o de proteínas de las mismas, que produzca el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la composición de la invención son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

Se entiende por "infección" en la presente invención aquella patología generada por la invasión o colonización de cualquier tejido de un hospedador

por parte de algún organismo del género *Acinetobacter*, preferiblemente *A. baumannii*.

5 Se entiende por “tejido blando” en la presente invención, todo aquel tejido no óseo presente en un organismo.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención el medicamento es una vacuna. En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una preparación antigénica empleada para provocar una respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que, una vez dentro del organismo, provocan la respuesta del sistema inmunitario mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

15 Los medicamentos y composiciones de la invención pueden utilizarse tanto solos como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el tratamiento o prevención de enfermedades producidas por organismos del género *Acinetobacter*.

20 Tanto los medicamentos como las composiciones de la invención pueden incluir, además, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición o de los medicamentos de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función
30 de protección del medicamento, como por ejemplo, para aislarlo del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico, la

función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

5 El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la
10 incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

15 El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de daños cuya causa sean células del género *Acinetobacter*, o cualquier derivado o producto metabólico de las mismas.

El término "antígeno" en esta memoria se refiere a una molécula (generalmente
20 una proteína o un polisacárido), que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar como antígenos, como las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se
30 proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra los niveles de anticuerpos frente a las proteínas de la membrana externa de *A. baumannii* en el suero de ratones a cero, dos y cuatro semanas en los ratones vacunados (Vacunado, n = 10), o en los controles que recibieron sólo adyuvante (Control, n = 10). Los niveles de anticuerpos en los ratones vacunados fueron significativamente más altos que en los ratones sin vacunar (*p = 0,001, test U de Mann-Whitney).

Figura 2. Muestra los niveles de anticuerpos frente a las proteínas de la membrana externa de varias cepas de *A. baumannii* en el suero de ratones después de dos inyecciones de la vacuna (Vacunado, n = 10), o dos inyecciones de sólo adyuvante (Control, n = 10). Los niveles de anticuerpos en los ratones vacunados fueron significativamente más altos que en los ratones sin vacunar (*p = 0,001, test de Student).

Figura 3. Muestra los recuentos bacterianos en los bazos 12 horas después de la inoculación en los ratones inmunizados (Vacunado; n=8) y los ratones controles (Control; n=8) con $1,6 \times 10^6$ ufc de la cepa ATCC 19606. *p < 0,001; test U de Mann-Whitney.

Figura 4. Muestra la supervivencia de los ratones vacunados (Vacunados; n = 8/grupo) y los ratones sin vacunar (Control; n = 8/grupo) después de la inoculación con: **A.** *A. baumannii* ATCC 19606 ($1,6 \times 10^6$ ufc); **B.** Ab-154 ($3,6 \times 10^6$ ufc); y **C.** 113-16 ($4,1 \times 10^6$ ufc). *p < 0,001; prueba log-rank.

Figura 5. Representa las muestras de preparaciones de proteínas de la membrana externa antes y después de la extracción de la endotoxina teñidas con tinción de azul de coomassie. **A.** carril 1: sin extracción; carril 2: extracción con 2% Triton X-100; carril 3: extracción con 2% Triton X-114. **B.** carril 1: sin extracción; carril 2: extracción con 2% SDS; carril 3: extracción con

5% SDS. Las flechas indican la proteína AbOmpA que fue extraída durante la eliminación de la endotoxina.

Figura 6. Muestra los niveles de IgG en grupos de ratones (n = 10/grupo) tras la inmunización con la preparación indicada. Los datos muestran los títulos para cada uno de los ratones y la mediana se representa con una línea. La línea horizontal discontinua representa el límite de detección de la ELISA.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. PREPARACIÓN DE LA VACUNA

Para preparar las células inactivadas la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 fue crecida en 250 ml de caldo de Mueller-Hinton hasta obtener una densidad óptica de 1,2 a 600 nm. Las bacterias fueron lavadas 2 veces con 100 ml del tampón de fosfato por centrifugación a 6.000 x g a 4°C durante 10 minutos. Las bacterias fueron resuspendidas en 10 ml del tampón de fosfato y se añadió formalina a una concentración final de 0,05 M. Las células fueron incubadas con la formalina durante 16 horas a temperatura ambiente para su inactivación. Para confirmar que las células fueron inactivadas, 10 µl de la suspensión de células inactivadas fueron sembrados en una placa de agar sangre, comprobando que no hubo crecimiento. Las células inactivadas fueron lavadas 3 veces con 100 ml del tampón del fosfato por centrifugación a 6.000 x g a 4°C durante 10 minutos. La concentración de las células inactivadas fue ajustada a 1×10^9 células/ml por espectrofotometría y por último fueron mezcladas con el

adyuvante de fosfato del aluminio a una proporción 1:1 (v/v).

EJEMPLO 2. INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS INACTIVADAS

5 Para caracterizar la respuesta inmune a la inyección de células inactivadas, 8 ratones C57BL/6 fueron inyectados intramuscularmente en ambas patas con 100 µl de la mezcla de la vacuna (1×10^8 células inactivadas+adyuvante) y se administró una segunda inyección tres semanas después. Como control negativo, en paralelo 8 ratones fueron inyectados con PBS más adyuvante (sin bacterias). Dos semanas después de la primera inyección y una semana después de la segunda inyección, se recogieron muestras de sangre de cada ratón que fueron utilizadas para determinar la cantidad de anticuerpos (IgG) frente a las proteínas de la membrana externa de *A. baumannii* por la técnica de ELISA. A las dos y cuatro semanas en todos los ratones inmunizados se detectaron niveles altos frente a las proteínas de la membrana externa, mientras que en los ratones controles inyectados con sólo el PBS+adyuvante no se detectaron anticuerpos (Figura 1). Para determinar si la inmunización con las células inactivadas produce anticuerpos capaces de reconocer antígenos de varias cepas de *A. baumannii*, las muestras de suero recogidas a las cuatro semanas fueron analizadas por ELISA utilizando proteínas de cuatro cepas clínicas. Como muestra la figura 2, la inmunización con células inactivadas produce anticuerpos capaces de reconocer antígenos de varias cepas.

Una semana después de la segunda inyección de la vacuna, los ratones fueron inoculados con $1,6 \times 10^6$ bacterias de la cepa ATCC 19606 de *A. baumannii* por inyección intraperitoneal. Doce horas después de la inoculación, se extrajeron los bazos de los ratones y se determinó la cantidad de bacteria en el tejido. En los bazos de los ratones inmunizados con las células inactivadas (Vacunado; Figura 3) se detectaron aproximadamente 4 log menos de bacteria que en los bazos de los ratones que recibieron sólo el adyuvante (Control; Figura 3).

Para determinar si la vacuna es capaz de proporcionar protección frente a la infección por *A. baumannii*, los ratones vacunados y los ratones control fueron inoculados por inyección intraperitoneal con las dosis indicadas de las cepas ATCC 19606, Ab-154 y 113-16. La supervivencia de los ratones fue monitorizada durante los 7 días siguientes. En todos los casos, los ratones inmunizados mostraron una tasa mayor de supervivencia comparada con los ratones sin inmunizar; ATCC 19606 (100% vs 12,5%); Ab-154 (100% vs 0%); 113-16 (87,5% vs 0%). La diferencia en supervivencia fue significativa estadísticamente para cada cepa ($p < 0,001$, prueba log-rank) (Figura 4).

10

EJEMPLO 3. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LAS MEMBRANAS EXTERNAS DE *A. BAUMANNII*

Las proteínas de la membrana externa de la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 fueron aisladas con el método descrito a continuación. La bacteria fue crecida en un litro de caldo de Mueller-Hinton hasta llegar a una densidad óptica de 0,8 a 600nm. Las células bacterianas fueron centrifugadas a 5.000 x g durante 10 minutos y el pellet bacteriano fue resuspendido en 10 mililitros de tampón fosfato 10mM a pH 7,2. Las células bacterianas fueron lisadas por sonicación, y las células no lisadas fueron eliminadas por centrifugación a 5.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue centrifugado a 18.000 x g durante 60 minutos a 4 °C para precipitar las membranas bacterianas. Las membranas internas fueron solubilizadas con una solución de 2% N-laurylsarcosinata en tampón fosfato 10mM a pH 7,2. Tras la solubilización, las membranas externas insolubles fueron precipitadas por centrifugación a 18.000 x g durante 60 minutos a 4 °C. Finalmente, las membranas externas purificadas fueron lavadas con 2 mililitros de Tris-Cl 62,5 mM, pH 6,8 y centrifugadas a 18.000 x g durante 60 minutos a 4 °C.

EJEMPLO 4. ELIMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS

Para eliminar las endotoxinas de las proteínas de la membrana externa se desarrolló un método consistente en dos pasos. En el primer paso las endotoxinas se disocian de las proteínas de la membrana externa con detergentes iónicos o no-iónicos. En el segundo paso, las endotoxinas disociadas y el detergente son eliminados por precipitación de las proteínas con metanol y cloroformo. Las membranas externas de *A. baumannii* fueron resuspendidas en 1 mililitro de Triton X-100 al 2%, Triton X-114 al 2%, SDS al 2%, o SDS al 5% a 4 °C y agitadas durante 5 minutos para disociar las endotoxinas. Las proteínas fueron precipitadas por la adición secuencial de 4 mililitros de metanol, 2 mililitros de cloroformo y tres mililitros de agua destilada. Tras mezclar, la solución fue centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas de nuevo en la solución de detergente y el proceso fue repetido 2 veces. Tras las tres extracciones, las proteínas fueron resuspendidas en un tampón de solubilización (Tris 50 mM, pH 7,4, urea 8 M, tiourea 2 M) para determinar la concentración de proteínas, o fueron resuspendidas en el tampón fosfato para determinar los niveles de endotoxina. La concentración de proteína fue determinada utilizando el Kit 2D Quant (GE Healthcare) y los niveles de endotoxina fueron determinados con el kit Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 Assay (Lonza). Los experimentos fueron realizados por triplicado.

El proceso completo de eliminación de endotoxinas puede ser realizado en menos de una hora utilizando reactivos comunes, baratos y disponibles comercialmente. Antes de la extracción, las proteínas de la membrana externa mostraron niveles altos de endotoxinas (>2000 unidades de endotoxina/μg proteína; Tabla 1). Tras la extracción con los detergentes utilizados se redujeron los niveles de endotoxina más del 96%. Sin embargo, con la extracción utilizando una solución de 5% SDS se eliminó hasta el 99,4% de endotoxina y se recuperó mayor cantidad de proteína.

Tabla 1. Comparación de los detergentes en la eliminación de endotoxinas.

Muestra	Recuperación de proteínas (%)	Unidades de endotoxina (media ± D.E.)	Reducción en endotoxina (%)
Detergentes Triton			
Sin extracción	---	2070 ± 96	---
2% Triton X-100	54,9	74,4 ± 3,9	96,4
2% Triton X-114	55,9	63,0 ± 2,1	97,0
SDS			
Sin extracción	---	2730 ± 16	---
2% SDS	74,3	56,7 ± 4,8	97,9
5% SDS	90,2	15,6 ± 5,4	99,4

5 **EJEMPLO 5. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE LA ENDOTOXINA EN LA COMPOSICIÓN DE PREPARACIONES DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA POR SDS-PAGE Y MALDI-TOF/TOF**

10 Cuatro µg de proteínas de la membrana externa de *A. baumannii* sin extracción de endotoxina y 4 µg de una muestra sin endotoxinas fueron separadas por SDS-PAGE y visualizadas con la tinción de Coomassie (Simply Blue SafeStain; Invitrogen). Aquellas proteínas menos abundantes tras la extracción de endotoxina fueron extraídas del gel e identificadas por MALDI-TOF/TOF MS.

15 Tras el proceso de extracción de la endotoxina con todos los detergentes se recuperó la mayoría de las proteínas, excepto una proteína de 36 kDa que fue casi completamente eliminada en el proceso (Figura 5). La proteína fue identificada como proteína A de la membrana externa de *Acinetobacter baumannii* (AbOmpA; número de acceso en UniProtKB: Q6RYW5).

EJEMPLO 6. INMUNIZACIÓN Y ELISAs

Preparaciones de las proteínas de la membrana externa sin extracción de la endotoxina y preparaciones sin endotoxinas fueron diluidas a una
 5 concentración de 125 µg/ml en el tampón fosfato y subsecuentemente diluidas 1:1 en al adyuvante, Adjuphos (Brenntag Biosector). Ratones C57BL/6 hembra de entre 8-10 semanas de edad fueron inmunizados intramuscularmente con las preparaciones (n = 10/grupo) inyectando 100 µl en cada cuadriceps (dosis = 25 µg proteína/ratón). Tres semanas tras la primera inyección, los ratones
 10 fueron inmunizados una segunda vez con la misma dosis. Como control, un grupo de ratones recibió dos inyecciones con tampón fosfato. Una semana después de la segunda inyección, se recogieron muestras de suero que fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis.

15 Para realizar los ELISAs, fueron utilizadas placas de 96 pocillos, con 0,3 µg de las proteínas de la membrana externa fijadas al fondo de cada pocillo. Los pocillos fueron lavados dos veces con una solución de PBS+ 0,1% Tween-20 (PBST) y bloqueados durante 30 minutos con una solución de PBST + 5% de leche desnatada en polvo (PBSTM). Tras dos lavados con PBST, diluciones
 20 seriadas de los sueros de los ratones en PBSTM fueron añadidas a los pocillos e incubadas durante 60 minutos. Las placas fueron lavadas dos veces con PBST y posteriormente fueron añadidos a cada pocillo 100 µl de IgG conjugado a peroxidasa de rábano (diluido 1:10.000 en PBSTM). Tras una incubación de una hora, las placas fueron lavadas tres veces con PBST y fueron añadidos a
 25 cada pocillo 100 µl de sustrato (Sigma) y se incubó durante 15 minutos. La reacción fue parada con la adición de 50 µl de 0,5 M H₂SO₄ y la absorbancia de cada pocillo fue medida a una longitud de onda de 450 nm. El título de la muestra fue definido como la dilución más alta en la que la absorbancia fue superior al resultado de los pocillos sin suero más 0,1.

30 Los ELISAs realizados con muestras de suero de los grupos de ratones mostraron que ambas preparaciones (membrana externa sin extracción de

endotoxina y preparaciones sin endotoxinas) produjeron niveles de anticuerpos altos tras dos inyecciones (Figura 6). La comparación de los niveles entre los dos grupos no mostró diferencia significativa ($p = 0,525$, test de U de Mann-Whitney).

5

EJEMPLO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los niveles de anticuerpos obtenidos en ambos grupos de ratones fueron comparados con el test de U de Mann-Whitney utilizando el programa SPSS versión 15.0 (SPSS Inc.). Un valor p de $< 0,05$ fue considerado significativo.

10

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende uno de los elementos seleccionados de la lista:
 - 5 a. células inactivadas del género *Acinetobacter*,
 - b. proteínas aisladas de células inactivadas del género *Acinetobacter*,
o una combinación de (a) y (b).

- 10 2. Composición según la reivindicación 1 donde las proteínas aisladas de (b) son proteínas de la membrana celular.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde las proteínas de (b) se obtienen mediante un método que comprende:
 - 15 i) disociar las proteínas de la membrana celular mediante la adición de un detergente a las células inactivadas del género *Acinetobacter*, y
 - ii) precipitar las proteínas disociadas en el paso (i).

- 20 4. Composición según la reivindicación 3 donde el detergente del paso (i) es SDS o Tritón.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 donde la precipitación de las proteínas en el paso (ii) se realiza mediante la adición de cloroformo y metanol.

- 25 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además comprende un adyuvante.

- 30 7. Composición según la reivindicación 6 donde el adyuvante se selecciona de la lista que comprende: fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, agonistas de los receptores tipo toll, citoquinas, escualeno, adyuvante incompleto de Freund o adyuvante completo de Freund.

8. Composición según la reivindicación 7 donde el adyuvante es fosfato de aluminio.
- 5 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde las células inactivadas del género *Acinetobacter* son de la especie *Acinetobacter baumannii*.
10. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la elaboración de un medicamento.
- 10 11. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la elaboración de un medicamento para la prevención de enfermedades producidas por organismos del género *Acinetobacter*.
- 15 12. Uso de una composición según la reivindicación 11 donde el organismo del género *Acinetobacter* pertenece a la especie *Acinetobacter baumannii*.
- 20 13. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 donde la enfermedad se selecciona de la lista que comprende: bacteriemia, meningitis, infección del tracto urinario, infecciones de la piel y tejidos blandos, infección del lecho quirúrgico o neumonía.
- 25 14. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 donde el medicamento es una vacuna.

FIG. 1

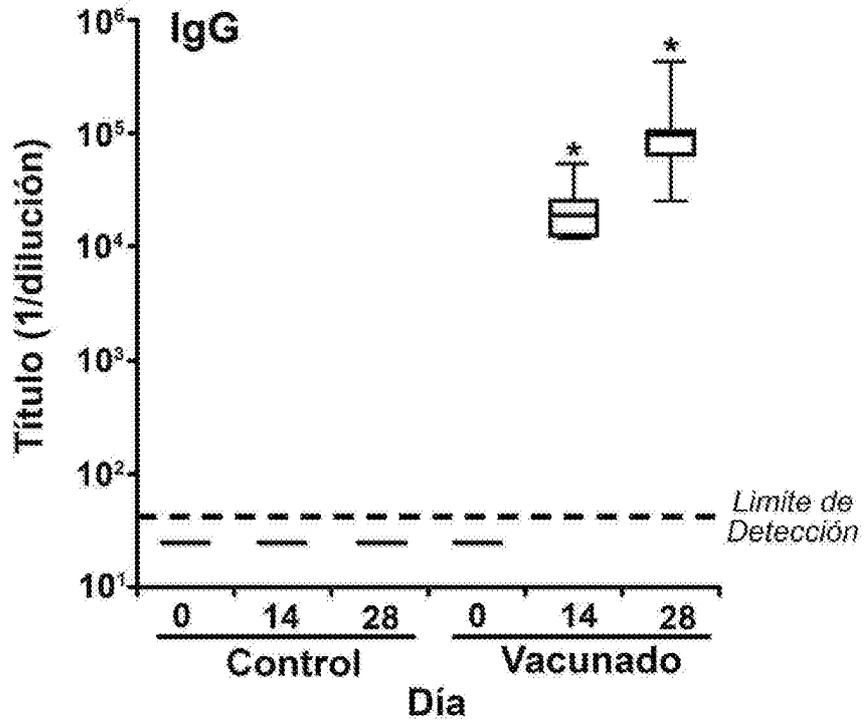


FIG. 2

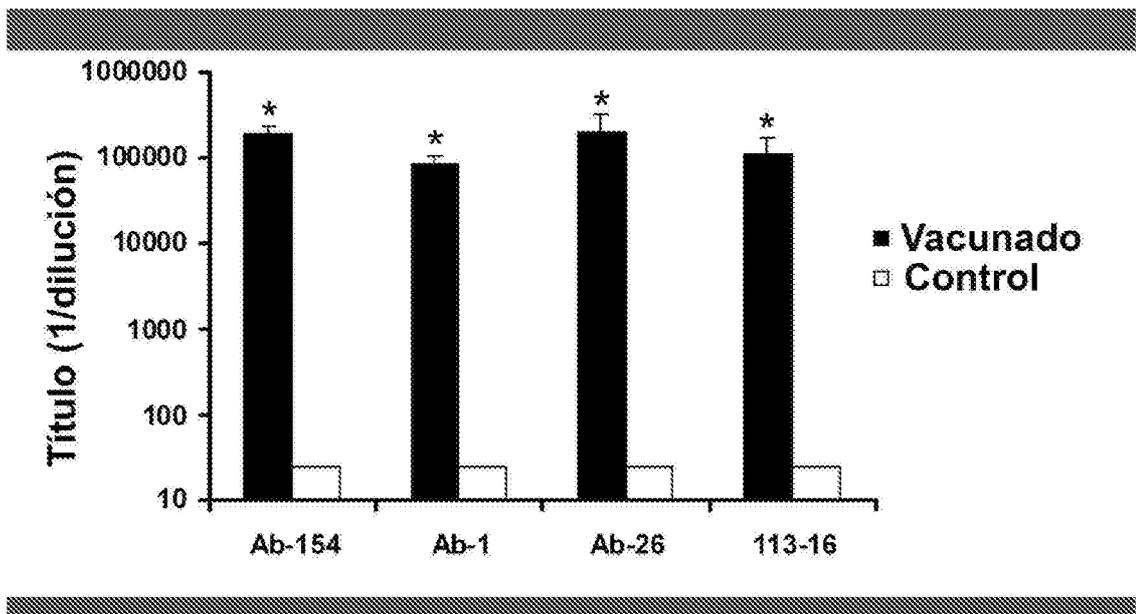


FIG. 3

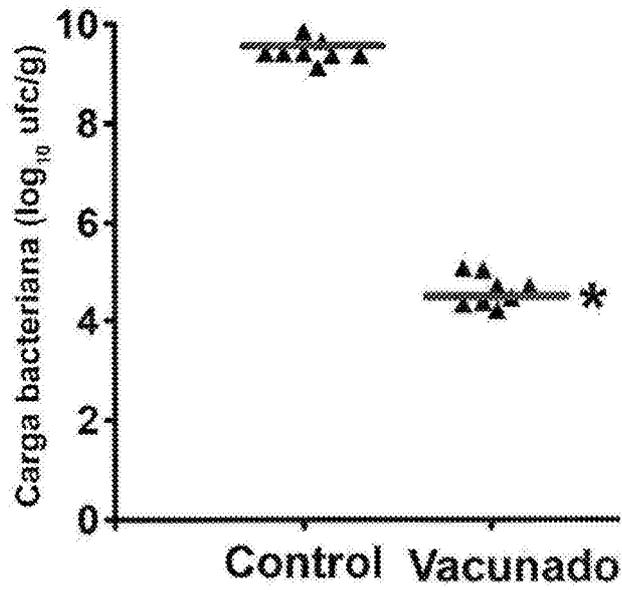


FIG. 4

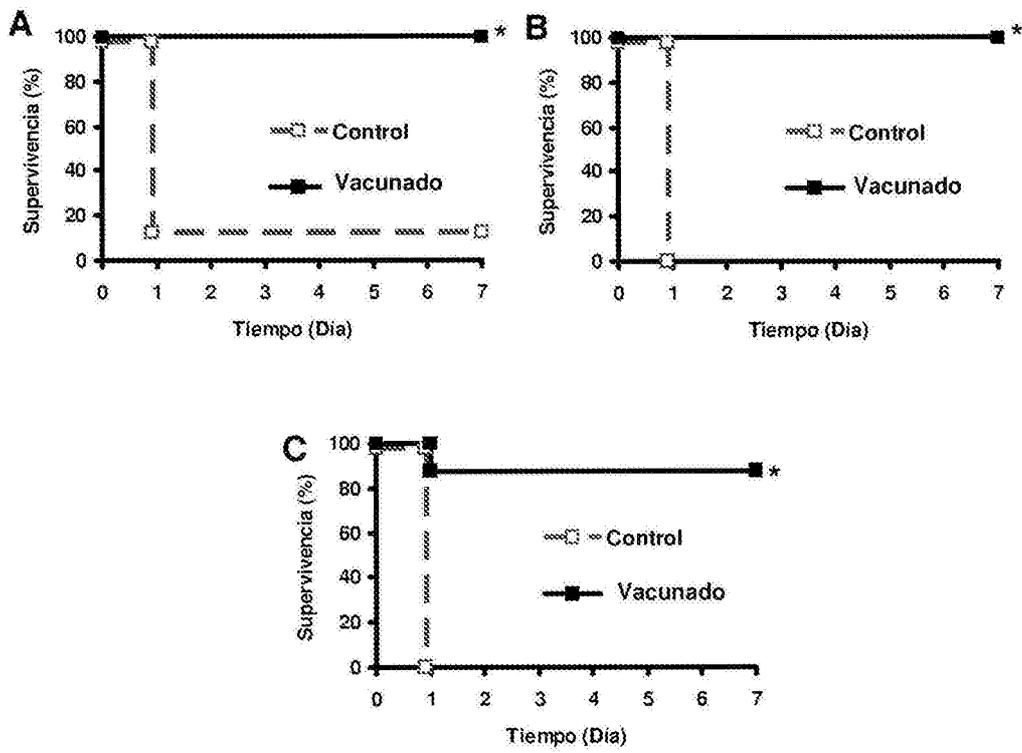


FIG. 5

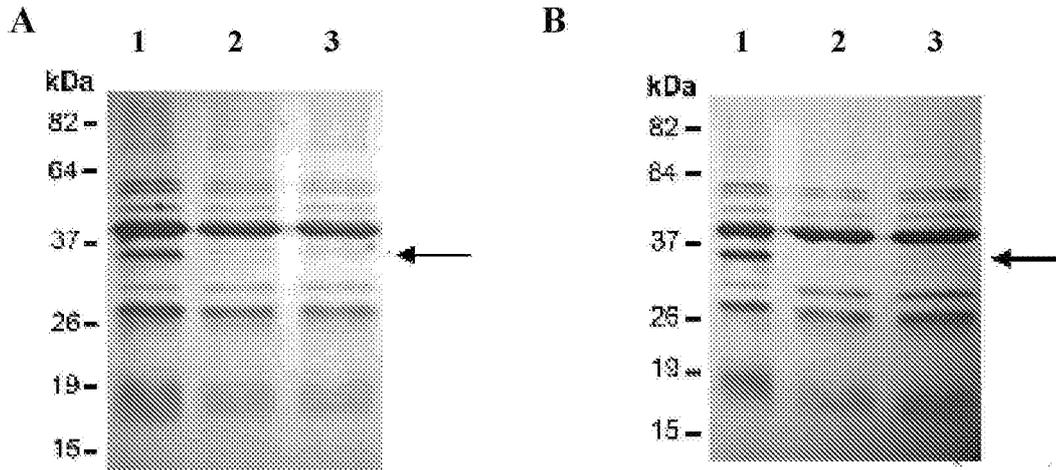
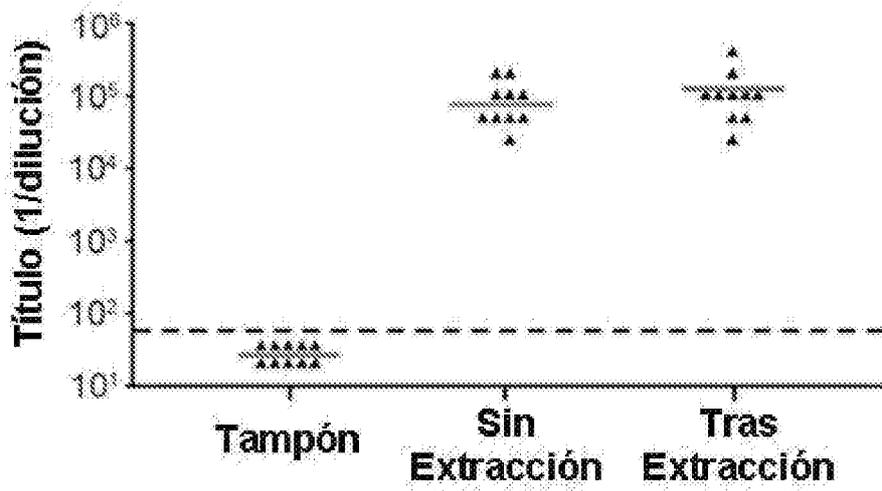


FIG. 6





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201030822

②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ ¹ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 6,713,062 B1 (JUANITA L. MERCHANT) 30.03.2004, todo el documento.	1-14
X	US 6,562,958 B1 (BRETON G. AND BUSH D.) 13.05.2003, todo el documento.	1,2,6-14
A	WESSEL D.; FLÜGGE U.I. "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY (abril 1984) Vol. 138, N.º. 1, páginas 141 - 143; DOI 10.1016/0003-2697(84)90782-6; todo el documento.	1-14
A	CHIN J.; DAI Y. "Selective extraction of outer-membrane proteins from membrane complexes of <i>Pseudomonas maltophilia</i> by chloroform-methanol" VETERINARY MICROBIOLOGY (marzo 1990) Vol. 22, N.º. 1, páginas 69 - 78; todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
05.09.2012

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K39/02 (2006.01)

C07K14/22 (2006.01)

A61P11/00 (2006.01)

A61P13/00 (2006.01)

A61P17/00 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 6,713,062 B1 (JUANITA L. MERCHANT)	30.03.2004
D02	US 6,562,958 B1 (BRETON G. AND BUSH D.)	13.05.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-14, es una composición que comprende células inactivadas del género *Acinetobacter* (concretamente de la especie *Acinetobacter baumannii*), o proteínas aisladas de dichas células (proteínas de la membrana celular) o una combinación de dichas células y proteínas, y un adyuvante (reiv. 1-2 y 6-9). Es también objeto de la invención el método para aislar dichas células que comprende el disociar las proteínas de la membrana celular con un detergente (SDS o Tritón), y precipitarlas con cloroformo y etanol (reiv. 3-5). Por último es también objeto de la invención el uso de la composición para la elaboración de una vacuna para prevenir enfermedades producidas por microorganismos del género *Acinetobacter* (concretamente de la especie *Acinetobacter baumannii*) (reiv. 10-14).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga composiciones compuestas por proteínas aisladas de la membrana externa de *Acinetobacter*, y métodos para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de enfermedades causadas por microorganismos de *Acinetobacter*. Entre las especies de *Acinetobacter* de las cuales aíslan las proteínas de la membrana externa, se encuentra *Acinetobacter baumannii*.

Una de las composiciones divulgadas se refiere a una vacuna compuesta por proteínas aisladas de la membrana celular (concretamente la proteína OMP A) y vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes o adyuvantes, como el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio. Dicha composición es útil tanto para el tratamiento como vacuna frente a enfermedades causadas por *Acinetobacter* como meningitis y neumonía (ver apartado VIII. Therapeutics: columna 54 línea 15-columna 55 línea 37). Aunque en la descripción de la solicitud de patente se excluye de las proteínas aisladas de la membrana celular de *A. baumannii* la proteína AbOmpA, con número de acceso Q6RYW5, debido a que durante el método de extracción de las proteínas reivindicado, se elimina por estar unida a las endotoxinas del microorganismo, se ha comprobado que la proteína divulgada en el documento D01 (OMP A) es distinta de la proteína identificada en la solicitud como AbOmpA.

El documento D02 divulga proteínas aisladas de *Acinetobacter baumannii*, útiles en diagnóstico, terapia, detección, prevención y tratamiento de las condiciones patológicas derivadas de la infección por dicho microorganismo, como bacteriemia, neumonía, meningitis, infecciones del tracto urinario, o infecciones del lecho quirúrgico. Uno de los usos de dichas proteínas es la elaboración de vacunas, compuestas por las proteínas aisladas de la membrana y un adyuvante (ver columna 9 líneas 38-45; columna 12 líneas 64-67) y columna 37 línea 60-columna 39 línea 20).

El que las proteínas aisladas de la membrana externa de la solicitud se obtengan de células inactivadas o no, es irrelevante, ya que en el caso de que en la composición reivindicada se componga únicamente de las proteínas aisladas, no conlleva ninguna mejora o ventaja técnica que las células de las que se extraen estén o no inactivadas.

El método de obtención de las proteínas aisladas de la membrana celular, objeto de las reivindicaciones 3-5, es conocido en el estado de la técnica, ya que la utilización de un detergente (SDS o Tritón) y la adición posterior de cloroformo y metanol, se sabe que tiene el efecto técnico de disociar las proteínas de la membrana celular (debido al detergente) y su posterior precipitación (debido a la adición del cloroformo y el metanol), como se puede comprobar en los documentos citados D03 y D04.

Por lo tanto, a la vista del estado de la técnica, las características de las reivindicaciones 1-14 ya son conocidas de los documentos D01-D04, donde han sido divulgadas. En consecuencia, el objeto de la invención tal y como se recoge en dichas reivindicaciones, no es nuevo a la vista del estado de la técnica conocido en el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes y carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.