



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 940**

51 Int. Cl.:
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02779603 .6**

86 Fecha de presentación : **31.07.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1416958**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Composición de vacuna que comprende al menos dos valencias, una coadyuvada, la otra no coadyuvada.**

30 Prioridad: **08.08.2001 FR 01 10573**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Sanofi Pasteur
2, avenue Pont Pasteur
69367 Lyon Cédex 07, FR**

72 Inventor/es: **Francon, Alain**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 284 940 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 284 940 T3

DESCRIPCIÓN

Composición de vacuna que comprende al menos dos valencias, una coadyuvada, la otra no coadyuvada.

5 La presente invención tiene particularmente por objeto una composición de vacuna bivalente Hepatitis A/Fiebre tifoidea (HA-Vi) estabilizada en la que la valencia Vi conserva su poder inmunogénico durante al menos aproximadamente 24 meses.

10 La hepatitis A y la fiebre tifoidea son dos enfermedades para las que se dispone ya de vacuna. Estas dos enfermedades se encuentran en regiones del globo donde las condiciones de higiene están lejos de ser óptimas. En la medida en que los respectivos agentes infecciosos tienen en común la misma vía de transmisión (vía oral-fecal) y en la medida en que las zonas endémicas de estas enfermedades se solapan ampliamente, parece interesante combinar las dos valencias en un mismo producto. En particular, se comprenderá fácilmente que, en la gama de las vacunas del viajero, una combinación HA-Vi sea más atractiva que las dos vacunas monovalentes HA y Vi que deben ser suministradas separadamente.

15 Ya se han realizado estudios con el fin de verificar que las valencias HA y Vi son compatibles especialmente en términos de inocuidad, poder inmunogénico y de estabilidad. Estos estudios utilizan combinaciones HA-Vi preparadas a partir de las vacunas monovalentes que ya existen en el mercado; son esencialmente dos: por una parte, los estudios realizados combinando las monovalentes HavrixTM (HA) y TypherixTM (Vi) producidas por SmithKline Beecham Biologicals (Rixensart, Bélgica) y por otra parte los estudios realizados combinando las monovalentes AvaximTM (HA) y Typhim Vi_iTM (Vi) producidas por Aventis Pasteur (Lyon, Francia).

20 En las dos series de estudios, la vacuna monovalente HA está constituida por el virus de la hepatitis A inactivado y adsorbido sobre hidróxido de aluminio. De igual forma, la vacuna monovalente de la fiebre tifoidea está constituida por el polisacárido de la cápsula de *Salmonella typhi* que permanece no coadyuvada. Por último, las combinaciones bivalentes se producen de manera idéntica, mezclando simplemente las vacunas monovalentes correspondientes (estas vacunas monovalentes se comercializan en forma líquida). Así, una dosis de AvaximTM y una dosis de Typhim Vi_iTM se mezclan juntas para dar una dosis de la combinación bivalente HA-Vi.

25 Las dos series de estudios se han realizado con combinaciones constituidas menos de veinte meses antes de que sean realizadas las inyecciones en el marco de los ensayos clínicos. Estos estudios han mostrado que las combinaciones bivalentes eran equivalentes a las monovalentes correspondientes, especialmente en términos de poder inmunogénico. Así, la combinación bivalente de SmithKline Beecham Biologicals ha satisfecho las exigencias de las autoridades de Gran Bretaña y ha recibido ya una autorización para la comercialización en ese país. Esta autorización tiene sin embargo por contra una fecha de caducidad establecida de 12 meses después de la fabricación.

30 En el campo de las vacunas, una fecha e caducidad de 12 meses no puede considerarse suficiente, teniendo en cuenta especialmente el tiempo necesario para los controles de los lotes antes de la distribución. Una fecha de caducidad establecida de 24 o, mejor aún, de 36 meses facilita enormemente la comercialización de los lotes.

35 Ahora bien, en el caso de las combinaciones HA-Vi, la solicitante se ha dado cuenta de que, más allá de 16-18 meses después de la fecha de fabricación, la valencia Vi perdía progresivamente su poder inmunogénico y ha emitido una hipótesis sobre el origen de esta inestabilidad. En efecto, los grupos O-acetilo del polisacárido Vi que son característicos de la inmunogenicidad de Vi, se hidrolizan en el tiempo, sobre todo en condiciones alcalinas. Esta hidrólisis se considera responsable de la disminución del poder inmunogénico del polisacárido Vi y sería debido a la adsorción del componente Vi sobre el hidróxido de aluminio que está presente en la combinación bivalente como coadyuvante de la valencia HA. La valencia Vi se adsorbe inmediatamente sobre el gel de aluminio una vez que las valencias monovalentes se mezcla una con otra. Esta adsorción entorpece mantener el polisacárido Vi en un ambiente alcalino. En efecto, estando cargado positivamente el hidróxido de aluminio, atrae los iones OH⁻ del medio, lo que ocasiona un aumento del pH en el microentorno del gel de aluminio donde se encuentra el Vi tras su adsorción. La hidrólisis de los O-acetilo en lo que a ella se refiere es un fenómeno muy lento cuyos efectos son realmente perceptibles al cabo de 16 - 18 meses aproximadamente.

40 No sólo la solicitante ha puesto en evidencia el problema de la inestabilidad de la valencia Vi a lo largo del tiempo, sino que propone una solución que consiste en añadir a la combinación bivalente un anión tal como un ion fosfato o citrato que impida la adsorción de la valencia Vi sobre el aluminio mientras se mantiene la valencia HA en forma coadyuvada.

45 Por lo tanto, en su enseñanza más general, la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende al menos dos valencias; (i) una primera valencia que está coadyuvada con hidróxido de aluminio y (ii) una segunda valencia que contiene un polisacárido de cápsula bacteriana que comprende uno o dos grupos O-acetilo y que no está adsorbida sobre hidróxido de aluminio gracias a lo cual la primera valencia está coadyuvada, debido a la presencia de un compuesto adicional que sirve para impedir la adsorción de la segunda valencia sobre el hidróxido de aluminio, sin perturbar la adsorción de la primera valencia.

50 Según un modo de realización ventajoso, la adsorción de la segunda valencia está impedida por la presencia de un compuesto aniónico protector siempre que presente todas las garantías de seguridad necesarias para una utilización con

finés de vacunaci3n. Este compuesto protector es un fosfato, un citrato o tambi3n un carbonato. Tambi3n es posible utilizar una combinaci3n de diferentes aniones, por ejemplo, una combinaci3n de iones fosfato y citrato. A t3tulo indicativo, es preciso que los iones fosfato puedan ser especialmente aportados por una soluci3n que contiene fosfato monopot3sico, fosfato dis3dico y cloruro de sodio.

5

El uso de un compuesto protector permite especialmente estabilizar la actividad antig3nica de la segunda valencia durante un tiempo prolongado (24 meses o m3s), con preferencia durante la conservaci3n a temperatura normal de almacenamiento o m3s elevada (v.g. 37°C). La estabilidad de la actividad inmunog3nica se puede estimar por t3cnicas diversas midiendo esta actividad en el momento en que la composici3n se fabrica y despu3s efectuando medidas id3nticas a lo largo del tiempo, o al menos 24 meses despu3s de la fecha de fabricaci3n, y comparando los resultados obtenidos. Cuando los datos num3ricos no han demostrado ser estad3sticamente diferentes entre s3, se debe considerar que la actividad inmunog3nica es estable. El t3tulo de la actividad inmunog3nica de un ant3geno se puede determinar por la t3cnica ELISA, en uso corriente en el campo de las vacunas.

La primera valencia puede ser cualquier valencia de vacuna sin restricci3n de tipo o estructura con tal que, claro est3, su coadyuvaci3n sea requerida. Se cita especialmente la valencia de hepatitis A (HepA o HA), la valencia de hepatitis B (HepB) y la valencia de neumococo. Esta primera valencia puede estar constituida por un virus inactivado, tal como el virus HA inactivado o el virus de la polio inactivado; un virus atenuado; un ant3geno subunitario viral o bacteriano, tal como el ant3geno de superficie del virus de la hepatitis B, la anatoxina dift3rica o tet3nica.

20

La segunda valencia, por definici3n, est3 constituida por un polisac3rido, conjugado o no, que contiene dentro de su unidad que se repite uno o dos grupos O-acetilo. El polisac3rido de la c3psula de *Salmonella typhi* (tambi3n llamado polisac3rido Vi) y el de la c3psula de *Neisseria meningitidis* grupo A responden a esta definici3n. Por tanto, en este caso se habla de valencia de Vi o fiebre tifoidea y de valencia de meningococo A.

25

Por "polisac3rido de c3psula bacteriana" se entiende un polisac3rido constituido por encadenamiento de la unidad que se repite caracter3stica de un polisac3rido de c3psula, cualquiera que sea su tama3o e independientemente de la modificaci3n anexa. La unidad que se repite de un polisac3rido que entra en la composici3n seg3n la invenci3n, comprende necesariamente al menos un grupo O-acetilo.

30

Para los fines de la presente invenci3n, el polisac3rido puede obtenerse en forma purificada a partir de la bacteria de origen seg3n t3cnicas completamente convencionales. Seg3n las necesidades, el polisac3rido puede estar (i) fragmentado o no fragmentado y (ii) conjugado o no conjugado con un polip3ptido portador tal como la anatoxina dift3rica o tet3nica.

35

En un contexto m3s espec3fico, la invenci3n tiene por objeto una composici3n de vacuna que comprende (i) la valencia de HA coadyuvada con hidr3xido de aluminio, (ii) la valencia de fiebre tifoidea constituida por polisac3rido de Vi, composici3n en la que la valencia de Vi no est3 adsorbida sobre hidr3xido de aluminio, y (iii) iones fosfato, citrato o carbonato.

40

Para los fines de la presente invenci3n, la primera valencia puede ser coadyuvada bien por precipitaci3n con hidr3xido de aluminio, o bien por adsorci3n sobre hidr3xido de aluminio.

El hidr3xido de aluminio que sirve para coadyuvar la primera valencia puede ser hidr3xido de aluminio puro (es decir un compuesto de aluminio que comprende iones Al³⁺ y iones hidroxilo) o cualquier hidr3xido de aluminio conocido por el mismo nombre aunque desde el punto de vista qu3mico no est3 constituido exclusivamente por hidr3xido de aluminio. As3, puede tratarse de compuestos mixtos de aluminio tales como los designados por el nombre de hidroxifosfato de aluminio o hidroxisulfato de aluminio. De manera general, se puede tratar de cualquier compuesto de aluminio que comprenda especialmente iones hidroxilo. A modo de ilustraci3n, se cita el hidr3xido de aluminio AlhydrogelTM comercializado por la firma Superfos Biosector.

50

Los iones fosfato, citrato o carbonato (compuesto protector) deben a3adirse en cantidad suficiente para impedir la adsorci3n de la segunda valencia mientras se mantiene la primera valencia en forma coadyuvada. Esta cantidad depende de diversos factores, entre ellos la cantidad y la naturaleza de la primera valencia, su modo de coadyuvaci3n, la cantidad y la naturaleza del hidr3xido de aluminio y la cantidad de la segunda valencia. El experto en la t3cnica familiarizado con el campo de las vacunas est3 perfectamente capacitado para tener en cuenta estos requisitos a fin de determinar la cantidad apropiada de compuesto que impide la adsorci3n de la segunda valencia una vez que los dem3s factores han sido establecidos, de tal suerte que el hidr3xido de aluminio sea saturado por los iones fosfato mientras se mantiene la primera valencia en forma coadyuvada.

55

Sin embargo, es preciso que las vacunas comerciales contengan de manera habitual de 0,6 a 1,5 mg de aluminio/ml. En las vacunas comercializadas de HepA, el gel de aluminio, presente a dosis convencionales (expresado en cantidad de aluminio), se encuentra ampliamente en exceso respecto del ant3geno de la HepA en la medida en que los sitios de adsorci3n del gel de aluminio est3n lejos de estar saturados. As3, en la pr3ctica, s3lo la cantidad de aluminio parece ser determinante para establecer la cantidad de compuesto protector que debe estar presente.

60

Para una composici3n seg3n la invenci3n que contiene 0,3 mg de aluminio en forma de hidr3xido de aluminio y en un volumen de 0,5 ml, conviene a3adir iones fosfato en concentraci3n aproximadamente 20 mM. Si la dosis de

ES 2 284 940 T3

aluminio es el doble para ese mismo volumen, conviene añadir el doble de concentración de iones fosfato, es decir 40 mM. Pero para una composición según la invención que contiene 0,6 mg de aluminio en un volumen de 1 ml, es suficiente una concentración 20 mM de iones fosfato.

5 A modo de ilustración, se indica que una vacuna bivalente según la invención puede contener en un volumen de 0,5 ml, (i) 160 unidades antigénicas o 1440 unidades ELISA de virus de la hepatitis A inactivados adsorbidos sobre (ii) hidróxido de aluminio que contiene 0,3 mg de aluminio; (iii) 0,025 mg de polisacárido Vi; y (iv) una concentración 20 mM de iones fosfato.

10 Las unidades antigénicas y las unidades ELISA citadas más arriba son, respectivamente, unidades establecidas con ayuda de ensayos ELISA de referencia apropiados para las firmas Aventis Pasteur y SmithKline Beecham Biologicals (van Hoecke *et al*, J. Travel. Med. (1998) 5 : 116 y André *et al*, en Prog. Med. Virol., Melnick JL Ed, Basel, Karger (1990) 37 : 72). No puede hacerse de otra manera puesto que no existe ninguna referencia normalizada internacional para la vacuna de HepA.

15 Una composición según la invención está ventajosamente en forma líquida y una dosis de vacuna se formula ventajosamente en un volumen comprendido entre 0,5 y 1 ml, ambos incluidos.

Una composición según la invención se puede realizar:

- 20 (i) añadiendo iones fosfato, citrato o carbonato a una preparación que contiene una valencia distinta de la valencia de fiebre tifoidea, coadyuvada por hidróxido de aluminio; y
- 25 (ii) mezclando la preparación obtenida en el punto (i) con una preparación que contiene la valencia de fiebre tifoidea.

Ejemplo

Preparación de una composición HA Vi según la invención

30 *A - Preparación del componente HA adsorbido*

35 99 ml de un lote de virus HA inactivado cuyo título antigénico es de 885 U ELISA/ml se mezclan con 5,94 ml de 2-fenoxi-etanol al 25%. La homogeneización se lleva a cabo durante 15 min y después la preparación se filtra sobre Millipak 40 MPGL 04SH2. Después de la filtración se obtienen 95 ml de una preparación con un título de 835 U ELISA/ml.

40 A esta preparación, se añaden 47,5 ml de un gel de alúmina que contiene 3,14 mg de aluminio/ml. Se completa con 48 ml de PBS (tampón fosfato) 40 mM. Se agita durante una noche a 5°C (18 h) para que el componente HA se adsorba sobre el gel de alúmina. El pH es de 7,28.

B - Preparación de una solución de polisacárido Vi concentrado 10 veces

45 Se prepara un polvo de polisacárido Vi según el método de Gotschlich *et al*, Prog. Immunobiol. Standard (1972) 5 : 485. En un matraz de 30 ml que contiene 16,64 mg de Vi (9,5 g% de humedad residual, es decir 15,06 mg de peso seco), se vierten poco a poco 25,1 ml de agua destilada preparada para inyección (ppi), con agitación continua. Se deja proseguir la agitación durante 24 h a 5°C con el fin de obtener la disolución completa del polisacárido. Esta preparación se filtra sobre un filtro Millex 0,22 µm GV SLGV 025. El filtro se lava con 5 ml de agua destilada ppi. El volumen final es, por tanto, de 30,1 ml.

50 *C - Preparación de vacuna bivalente de HAVi*

55 A 62 ml de la preparación obtenida en el punto A (HA), se añaden 10,6 ml de una solución de fosfato 94 mM, y después 8,1 ml de la preparación obtenida en el punto B (Vi). Las características de la vacuna así obtenida son las siguientes:

Concentración final en fosfato: 20 mM

pH: 7,3

60 Osmolaridad: 578 mosm/kg

Esta preparación, llamada preparación P2, se reparte a continuación en dosis de 0,5 ml.

65 En paralelo se han preparado también otras dos composiciones bivalentes P2' y P2'' que no contienen 20 mM de fosfato, sino, respectivamente, 10 y 40 mM de fosfato. Para hacer esto, se añaden 10,6 ml de una solución de fosfato 17,6 mM o 246 mM según la especie.

ES 2 284 940 T3

El comportamiento de los componentes HA y Vi en las composiciones P2, P2' y P2'' se ha estudiado inmediatamente dosificando estos componentes por ELISA en las composiciones tal cuales o después de centrifugarlas. Se ha constatado que a 10 mM de fosfato, el HA permanecía adsorbido pero Vi se adsorbía sobre el gel de alúmina mientras que a 40 mM de fosfato el Vi no se adsorbía más pero el HA se desorbía parcialmente. A 20 mM de fosfato, se cumplen las condiciones buscadas: el HA permanece adsorbido mientras que el Vi no se adsorbe.

A continuación, se ha estudiado la estabilidad de las dosis a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 30 meses. Se ha evaluado especialmente por ELISA la capacidad antigénica del polisacárido Vi en las dosis de vacunas tomadas en su integridad y en el sobrenadante después de la centrifugación (el componente adsorbido sobre el gel de alúmina sedimenta con el gel); ello permite además establecer el porcentaje de Vi no adsorbido.

El ELISA se lleva a cabo por el método indirecto. El antígeno Vi que se ha de dosificar se pone intercalado entre anticuerpos anti-Vi que tapizan el fondo de una placa y anticuerpos anti-Vi de ratón. Se añade un anticuerpo anti IgG de ratón biotinilado, y después el complejo de estreptavidina biotinilado se acopla a peroxidasa de rábano. La reacción se revela por adición de sustrato dihidrocloruro de orto-fenilendiamina (OPD). La degradación de OPD se traduce por una coloración naranja oscura proporcional a la cantidad de antígeno Vi. Su intensidad se mide espectrofotométricamente.

En placas de 96 pocillos, se reparten $100\ \mu\text{l}$ de suero anti *Salmonella typhi*. Se deja incubar 5 h a 37°C y después se vacía la placa y se efectúan 3 lavados en PBS (tampón fosfato) Tween al 0,05%. Los sitios libres se saturan añadiendo $200\ \mu\text{l}$ de una solución de leche en polvo diluida en PBS. Se incuba durante 1 h 30 min a 37°C y después se vacía la placa y se efectúan 3 lavados. Se preparan diluciones en serie al doble de una vacuna patrón para obtener una gama patrón. Las dosis de vacuna que se van a valorar así como una dosis de referencia (que permite verificar la gama de patronaje) se diluyen de manera apropiada; se reparten $100\ \mu\text{l}$ de cada dilución en las cúpulas y se deja incubar durante una noche a 37°C . Se vacía la placa y se procede con los lavados. A continuación, se añaden $100\ \mu\text{l}$ por cúpula de un suero de ratón anti-Vi diluido de manera apropiada. Se deja incubar durante 1 h a 37°C y seguidamente se vacía la placa y se procede con los lavados. Luego se fijan las anti-immunoglobulinas de ratón biotiniladas ($100\ \mu\text{l}$ por cúpula de una dilución apropiada). Se deja incubar durante 1 h a 37°C y seguidamente se vacía la placa y se procede con los lavados. Entonces se fija la estreptavidina biotinilada acoplada a la peroxidasa ($100\ \mu\text{l}$ por cúpula de una dilución apropiada). Se deja incubar durante 1 h a 37°C y seguidamente se vacía la placa y se procede con los lavados. Se revela la placa añadiendo $100\ \mu\text{l}$ por cúpula de una solución de OPD a 1 mg/ml en tampón citrato fosfato pH 5. Se deja incubar 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad antes de añadir $100\ \mu\text{l}$ de ácido sulfúrico 2 N en las cúpulas. La lectura de la placa se efectúa espectrofotométricamente a 492 nm. Se establece la curva patrón de la adsorbancia en función de la concentración, El título de cada una de las diluciones ensayadas se calcula en relación con la curva patrón y se expresa en ng/ml. Para obtener el título medio de cada dosis de vacuna ensayada se hace la media de títulos obtenidos con el conjunto de diluciones. El título se da en $\mu\text{g}/\text{dosis}$.

Se mide también la cantidad de O-acetilos del polisacárido Vi presente en el sobrenadante, después de la centrifugación. Los O-acetilos se titulan por un método colorimétrico utilizando hidroxilamina (Hestrin S. J. Biol. Chim. (1949) 180 : 249). La hidroxilamina en medio alcalino forma con los ésteres un ácido hidroxámico que, en presencia de sal férrica da una coloración marrón cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 540 nm.

Se realiza en paralelo un estudio idéntico con una preparación llamada preparación P1, preparada de la misma manera que P2, con la única diferencia de que no se añade fosfato en el momento de la constitución de la vacuna bivalente. En este caso, el componente Vi se adsorbe inmediatamente sobre el gel de alúmina y para realizar su dosificación después de la centrifugación, como para P2, conviene desorberlo previamente. Esta desorción se obtiene por modificación del pH y de la fuerza iónica del medio. Después de la centrifugación, el gel de alúmina se pone en contacto con una solución de citrato trisódico 150 mM durante 6 h a 37°C . Después se centrifuga para recuperar el sobrenadante, donde se encuentra el componente Vi.

Los resultados se presentan en la tabla I siguiente.

TABLA I

5°C	T 0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses
Vi en la vacuna entera	P2	25,5	21,7	21,3	18,5	23,7	24,3	26,5
	P1	23,3	22,2	19,8	17,9	20,5	18,6	19,3
Vi en el sobrenadante de la centrifugación	P2	26	23,1	21,8	17,9	25	21,9	25,8
	P1	16,9	16,5	15,4	12	14,7	21,8	15,7
O-acetilos (µmol/dosis)	P2	0,148	0,116	0,117	0,130	0,134	0,095	0,143
	P1	0,056	0,055	0,055	0,061	0,057	0,090	0,054
polisacáridos (µg/dosis)	P2	30,5	27,6	31	30,4	29,1	31,7	29,3
	P1	22	15,6	16,2	18,5	16,5	17	18,4
% de desorción de Vi en P1	86 %	72 %	74 %	78 %	67 %	72 %	63 %	81,6 %

ES 2 284 940 T3

La estabilidad de la formulación P2 ha sido estudiada también a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses y a $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 3 meses. Los resultados se presentan en las Tablas II y III siguientes.

TABLA II

25°C			T 0	1 mes	3 meses	6 meses
Vi en la vacuna entera	Vi ELISA ($\mu\text{g}/\text{dosis}$)	P2	23,6	23,6	21,7	20,6
		P1	24,4	19,6	11,3	7,4
Vi en el sobrenadante después de la centrifugación	Vi ELISA ($\mu\text{g}/\text{dosis}$)	P2	24,3	25,5	22,6	20,1
		P1	21	15	10,3	6,3
	O-acetilos ($\mu\text{mol}/\text{dosis}$)	P2	0,127	0,130	0,103	0,137
		P1	0,081	0,053	0,041	0,029
	polisacáridos ($\mu\text{g}/\text{dosis}$)	P2	32,5	31,6	25,5	27,2
		P1	20,8	17,3	10,3	6,3
% de desorción de Vi en P1			86 %	77 %	91 %	85 %

TABLA III

37°C			T 0	1 mes	3 meses
Vi en la vacuna entera	Vi ELISA ($\mu\text{g}/\text{dosis}$)	P2	23,6	24,1	21
		P1	24,4	12,7	5,6
Vi en el sobrenadante después de la centrifugación	Vi ELISA ($\mu\text{g}/\text{dosis}$)	P2	24,3	25,5	21,1
		P1	21	9,9	4,7
	O-acetilos ($\mu\text{mol}/\text{dosis}$)	P2	0,127	0,143	0,104
		P1	0,081	0,050	0,026
	polisacáridos ($\mu\text{g}/\text{dosis}$)	P2	32,5	36	22,5
		P1	20,8	15,4	9,9
% de desorción de Vi en P1			86 %	78 %	84 %

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición de vacuna que comprende (i) una primera valencia coadyuvada con un compuesto de aluminio que comprende iones hidroxilo (ii) una segunda vacuna que contiene un polisacárido de cápsula bacteriana que comprende uno o más grupos O-acetilo y (iii) iones fosfato, citrato o carbonato.

10 2. Una composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que la primera valencia es la valencia de hepatitis A.

10 3. Una composición de vacuna según la reivindicación 2, en la que la valencia de hepatitis A está constituida por virus de la hepatitis A inactivados.

15 4. Una composición de vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la segunda vacuna es la valencia de fiebre tifoidea que está constituida por el polisacárido Vi de la cápsula de *Samonella typhi*.

15 5. Una composición de vacuna según la reivindicación 4, en la que la valencia de fiebre tifoidea posee un título antigénico estable durante al menos 24 meses.

20 6. Una composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la primera valencia está coadyuvada por un compuesto de aluminio que es hidróxido de aluminio o hidroxifosfato de aluminio.

25 7. Una composición según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la primera valencia está coadyuvada por adsorción sobre un compuesto de aluminio.

25 8. Un procedimiento de fabricación de una composición de vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 7, según el cual:

30 (i) se añaden iones fosfato, citrato o carbonato a una preparación que contiene una primera valencia coadyuvada por un compuesto de aluminio que comprende iones hidroxilo; y

(ii) se mezcla la preparación obtenida en el punto (i) con una preparación que contiene una segunda valencia constituida por un polisacárido de cápsula bacteriana que comprende uno o más grupos O-acetilo.

35

40

45

50

55

60

65