



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 557**

51 Int. Cl.:
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07803333 .9**
96 Fecha de presentación : **07.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2066344**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

54 Título: **Vacunas de combinación de poliovirus inactivado.**

30 Prioridad: **07.09.2006 GB 0617602**
21.12.2006 GB 0625593

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

73 Titular/es: **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es: **De Hemptinne, Herve;**
Duchene, Michel;
Mary, Anne y
Sonveaux, Marc

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 557 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas de combinación de Poliovirus inactivado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las vacunas para proteger contra la poliomielitis y, en particular, a las vacunas de combinación para proteger contra la poliomielitis, la difteria, el tétanos y la tos ferina.

Antecedentes

10 Las vacunas de combinación (que proporcionan protección contra múltiples patógenos) son muy deseables con el fin de reducir al mínimo la cantidad de inmunizaciones necesarias para conferir protección contra múltiples patógenos, para reducir los costes de administración y para aumentar la aceptación y las tasas de cobertura. El fenómeno bien documentado de la competencia antigénica (o interferencia) complica el desarrollo de vacunas de múltiples componentes. La interferencia antigénica se refiere a la observación de que la administración de antígenos múltiples a menudo da lugar en una disminución de la respuesta a determinados antígenos en relación a la respuesta inmunitaria observada cuando se administran tales antígenos individualmente, por separado.

15 Se conocen vacunas de combinación que pueden prevenir la infección por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y opcionalmente poliovirus inactivado (IPV), y/o la infección por virus de la hepatitis B, y/o por *Haemophilus* tipo B (véase por ejemplo los documentos WO 93/24148, WO 97/00697 y WO 2000/030678).

20 Después de muchos años de investigación, la dosis estándar de las vacunas contra la polio aceptada como eficaz en la comunidad de vacunas actualmente contiene 40 unidades de antígeno D del poliovirus tipo 1 (Mahoney) inactivado, 8 unidades de antígeno D del poliovirus tipo 2 (MEF-I) inactivado y 32 unidades de antígeno D de poliovirus tipo 3 (Saukett) inactivado (por ejemplo, Infanrix-IPV™). Dragunsky y col. describen "la evaluación de la inmunogenicidad y de las propiedades protectoras de las vacunas de virus de la poliomielitis inactivados" (Journal of Infectious Diseases, (2004) 190:1402-1412). Herremans y col. describen que la inducción de la inmunidad de las membranas mucosales por la vacuna de virus de la poliomielitis inactivado depende del contacto previo de las mucosas con el virus vivo, (Journal of Immunology (1999) 162: 511-5018). Doe y col. describen "el progreso con las vacunas de virus de la poliomielitis inactivado procedente de las cepas Sabin" (Developments in Biologicals' (2001) 105: 163-169).

25 Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que dosis reducidas de IPV pueden mantener un nivel adecuado o un mejor nivel de protección contra la poliomielitis. Tales vacunas aportan ventajas considerables, incluyendo la capacidad de proporcionar más dosis de las vacunas IPV a los individuos que lo necesitan.

Resumen de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona una vacuna IPV que comprende:

(a) toxoide diftérico;

(b) toxoide tetánico;

35 (c) células completas muertas de *Bordetella pertussis*; o dos o más componentes acelulares de pertussis (Pa) (por ejemplo toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y pertactina (PRN)), y

(d) poliovirus tipo 1 inactivado en una dosis superior a 10 unidades de antígeno D e inferior a 20 unidades de antígeno D,

en la que la vacuna está sustancialmente libre de tiomersal.

40 La presente invención proporciona una vacuna IPV de la invención que comprende el poliovirus tipo 1 inactivado en una dosis superior a 10 unidades de antígeno D e inferior a 20 unidades de antígeno D, por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 unidades de antígeno D.

45 En una forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna IPV de la invención que comprende el poliovirus tipo 3 inactivado en una dosis de 8 a 20 unidades de antígeno D, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de antígeno D.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna IPV de la invención que comprende el poliovirus tipo 2 inactivado en una dosis de 2 a 4 unidades de antígeno D, por ejemplo, 2, 3 o 4 unidades de antígeno D.

50 La presente invención proporciona una vacuna IPV de la invención que es una vacuna de combinación DTP-IPV sustancialmente libre de tiomersal que comprende el poliovirus tipo 1 inactivado en una dosis de entre 10 y 20

unidades de antígeno D.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna de combinación DTP-IPV libre de tiomersal de la invención que comprende el poliovirus tipo 2 inactivado en una dosis de 2 a 7 unidades de antígeno D, por ejemplo, 5, 6 o 7 unidades de antígeno D.

- 5 En otra forma de realización, la presente invención una vacuna de combinación DTP-IPV libre de tiomersal de la invención que comprende el poliovirus tipo 3 inactivado en una dosis de 8 a 29 unidades de antígeno D, por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 unidades de antígeno D.

10 En otra forma de realización, las vacunas de la presente invención también puede comprender uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en: antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno(s) de *Haemophilus influenzae* b, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* A, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* C, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* W, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* Y, vesículas de membrana externa o antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* B, antígeno(s) de hepatitis A y antígeno(s) de *Salmonella typhi*, en particular, sacáridos capsulares antigénicos de dichas bacterias.

También se proporcionan los procedimientos de fabricación de las vacunas de la invención.

15 **Definiciones**

El término “vacuna” puede sustituirse opcionalmente con el término “composición inmunogénica”, y viceversa.

10 “Unidades de antígeno D” (también conocida como “unidades internacionales” o UI): La forma antigénica D del virus de la poliomielitis induce la producción de anticuerpos neutralizantes protectores. Las unidades de antígeno D a las que se hace referencia en el presente documento (por ejemplo, en las vacunas de la invención) son las unidades de antígeno D totales medidas de cada tipo de antígeno IPV a granel no adsorbido antes de la formulación de la vacuna final, que se añaden en cada dosis para seres humanos de la vacuna formulada (por lo general, volumen final de 0,5 ml). En la técnica son muy conocidos los procedimientos fiables para medir las unidades del antígeno D, los mismos están publicados, por ejemplo, por la Farmacopea Europea. Por ejemplo, las unidades de antígeno D se pueden medir utilizando la prueba de ELISA como se describe en el Ejemplo 1 (“Cuantificación del antígeno D por ELISA”) a 25 continuación. La Farmacopea Europea proporciona una muestra de prueba (European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation, disponible de Ph. Eur. Secretariat, por ejemplo, Código P 216 0000) para la estandarización de tales procedimientos entre los fabricantes (Pharmeuropa Special Issue, Bio 96-92). Por consiguiente, en la técnica se comprende bien el valor de unidad de antígeno D.

30 El término “dosis” en el presente documento es típicamente una administración de la vacuna de la invención, que suele ser una inyección. Una dosis típica para seres humanos es de 0,5 ml. Por supuesto, se pueden administrar varias dosis en un programa de administración de la vacuna.

35 El término “IPV” o una vacuna que comprende estos componentes se entiende en el presente documento como el virus de la polio tipo 1 inactivado (por ejemplo, Mahoney, como se utiliza de preferencia, o Brunhilde según se comercializa por Statens Serum Institut, bajo el nombre de DiTeKiPol), tipo 2 inactivado (por ejemplo, MEF-1) o tipo 3 inactivado (por ejemplo, Saukett), o una combinación de dos o tres de estos tipos. Un ejemplo de una vacuna IPV de dosis completa (o estándar) (40-8-32 unidades de antígeno D de los tipos 1, 2 y 3 de IPV, respectivamente) para los efectos de la presente invención puede ser Poliorix® (GSK Biologicals SA). Por lo tanto, en el caso en que se establece en el presente documento que en una vacuna de la invención está presente el X% de una dosis estándar de IPV, se entiende que la cantidad de unidades de antígeno D que equivale a un X% de 40, 8 y/o 32 unidades de antígeno D de los tipos 1, 2 y/o 3 de IPV, respectivamente (medidos en cada tipo de antígeno de IPV a granel) están formuladas dentro de cada dosis de dicha vacuna.

Los términos “lipopolisacárido” (LPS) y “lipooligosacárido” (LOS) se utilizan indistintamente.

45 El término “sacárido” a lo largo de la presente memoria descriptiva puede indicar un polisacárido o un oligosacárido e incluye a ambos. El antígeno formado por sacáridos capsulares puede ser un polisacárido de longitud total o puede tener la extensión correspondiente a “sacáridos” y “oligosacáridos” bacterianos (que, naturalmente, tienen un número bajo de unidades de repetición, o que son polisacáridos de tamaño reducido para facilitar su manipulación, pero que aún son capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora en un huésped) que son bien conocidos en la técnica de producción de vacunas (véase por ejemplo, documento EP 497525).

50 La expresión “ácido nucleico” en el presente documento puede comprender ácido desoxirribonucleico (ADN) monocatenario o bicatenario o ácido ribonucleico (ARN) monocatenario o bicatenario, o una mezcla de los mismos.

El término “componente(s)” de un agente patógeno o la expresión “componente(s) que dan protección frente a tal agente patógeno” dentro de las vacunas de la invención en el presente documento significa uno o más de antígenos de ese agente patógeno.

Los términos “alrededor de” o “aproximadamente” se toman en el presente documento en el sentido de indicar ±

10% del valor establecido, pero deben estar en consonancia con el contexto de uso.

Descripción de las figuras

Figura 1. Evolución de la Potencia Relativa (PR) de DTPwSF-HB-IPV “Procedimiento de producción 3” con la dosis de IPV.

- 5 Se examinó la potencia de la vacuna IPV de dosis reducida de las formulaciones del “Procedimiento de producción 3” in vivo en comparación con la formulación de referencia (formulación Poliorix y DTPaIPVHB). Se midió la PR de IPV en dosis de 100%, 50%, 25% y 12,5% de la dosis estándar de IPV (40/8/32 unidades de antígeno D para los tipos 1/2/3).

Figura 2. Diagrama de flujo de la evolución de la Potencia Relativa (PR) de la formulación DTPwSF-HB-IPV.

- 10 Se examinó la potencia de la vacuna IPV de dosis reducida para ambas formulaciones “Procedimiento de producción 3” y “Procedimiento de producción 4” in vivo en comparación con las formulaciones de referencia (formulación Poliorix y DTPaIPVHB). La PR se midió tanto para el “Procedimiento de producción 3” como para el “Procedimiento de producción 4” en dosis del 25% de la dosis estándar de IPV (40/8/32 unidades de antígeno D para los tipos 1/2/3) en comparación con un placebo con 25% de IPV solo.

15 Figura 3. Potencia relativa de los tipos 1, 2 y 3 de IPV en el tiempo 0 y a los 8 meses.

Se midió la potencia relativa de IPV [en comparación a DTPaHBIPV (Pediarix) (Figura 3a) o Poliorix (Figura 3b)] para determinar si el componente de Hib tiene un efecto sobre la potencia de IPV y para evaluar la estabilidad del IPV con el tiempo a diferentes dosis de IPV.

Descripción detallada

- 20 La presente invención proporciona una vacuna IPV que comprende:

(a) toxoide diftérico;

(b) toxoide tetánico;

(c) células completas muertas de *Bordetella pertussis*; o dos o más componentes acelulares de pertussis (Pa) (por ejemplo toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y pertactina (PRN)), y

- 25 (d) poliovirus tipo 1 inactivado en una dosis superior a 10 unidades de antígeno D e inferior a 20 unidades de antígeno D,

en la que la vacuna está sustancialmente libre de tiomersal.

Los antígenos de la invención

Componentes de la vacuna IPV

- 30 Las vacunas de la invención están compuestas por IPV tipo 1 y pueden opcionalmente comprender IPV tipo 2 y/o tipo 3.

Los procedimientos de preparación de poliovirus inactivado (IPV) son muy conocidos en la técnica. En una forma de realización, el IPV debe comprender los tipos 1, 2 y 3, como es común en la técnica de preparación de vacunas, y puede ser la vacuna contra la polio de Salk que se inactiva con formaldehído (véase, por ejemplo, Sutter y col., 2000, *Pediatr. Clin. North Am.* . 47: 287; Zimmerman y Spann 1999, *Am Fam Physician* 59: 113; Saik y col., 1954, *Official Monthly Publication of the American Public Health Association* 44(5): 563; Hennesen, 1981, *Develop. Biol. Standard* 47:139; Budowsky, 1991, *Adv. Virus Res.* 39:255).

- 35 En una forma de realización, el IPV no se adsorbe (por ejemplo, antes de mezclarlo con otros componentes, si están presentes). En otra forma de realización, el (los) componente(s) de IPV de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio (por ejemplo, antes o después de mezclarlos con otros componentes, si están presentes). En otra forma de realización, el (los) componente(s) de IPV de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, el (los) componente(s) de IPV pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Si se realiza la adsorción, uno o más componentes de IPV pueden ser adsorbidos por separado o juntos en una mezcla.
- 40 El IPV puede estabilizarse por medio de un proceso de secado específico como se describe en el documento WO 2004/039417.

- 45 El Poliovirus puede cultivarse en cultivos celulares. El cultivo celular puede ser una línea de células VERO o PMKC, que es una línea celular continua derivada de riñón de mono. Las células VERO pueden cultivarse de manera conveniente en microportadores. El cultivo de las células VERO antes y durante la infección viral puede implicar la utilización de materiales de origen bovino, como el suero de ternera, y este material debe obtenerse de fuentes que
- 50

estén libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). El cultivo puede también implicar la utilización de materiales como hidrolizado de lactoalbúmina. Después del crecimiento, los viriones pueden ser purificados mediante técnicas tales como la ultrafiltración, la diafiltración y la cromatografía. Antes de la administración a los pacientes, el virus debe ser inactivado, y esto se puede lograr mediante el tratamiento con formaldehído.

- 5 Los virus pueden ser cultivados, inactivados y purificados por separado, y a continuación se combinan para dar una mezcla concentrada a granel para su uso en la vacuna IPV o para la adición a los componentes adsorbidos de la difteria, el antígeno tetánico y los componentes de pertussis para vacunas que comprenden DTPw-IPV o DTPa-IPV.

- 10 Los antígenos en las vacunas de la invención estarán presentes en “cantidades inmunológicamente eficaces”, es decir, la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie de dosis, es eficaz para el tratamiento o la prevención de enfermedades. La dosis de tratamiento puede ser un programa de una única dosis o un programa de varias dosis (por ejemplo, que incluye dosis de refuerzo).

Las dosis estándar de vacunas contra la polio hoy en día tienden a contener 40 unidades de antígeno D del poliovirus tipo 1 inactivado, 8 unidades de antígeno D del poliovirus tipo 2 inactivado y 32 unidades de antígeno D del poliovirus tipo 3 inactivado (por ejemplo, Infanrix-IPV™).

- 15 Sin embargo, los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que se puede utilizar dosis reducidas de IPV para obtener una buena respuesta inmunitaria. Una dosis de la vacuna IPV de la presente invención comprende IPV tipo 1 en una dosis superior a 10 unidades de antígeno D e inferior a 20 unidades de antígeno D (por ejemplo, 12-19 unidades de antígeno D, 14-18,5 unidades de antígeno D o 15-17 unidades de antígeno D; por ejemplo alrededor de o exactamente 16 unidades de antígeno D de IPV tipo 1). En una forma de realización, una dosis de la vacuna IPV de la presente invención puede comprender 26-49%, 30-45%, 33-40%, 35-37%, o aproximadamente o exactamente un tercio de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D de IPV tipo 1 (equivalente a aproximadamente 10,4-19,6, 12-18, 13,2-16, 14-14,8 o 13,3 unidades de antígeno D).

- 20 En otra forma de realización, las vacunas de la presente invención pueden comprender menos de 4 unidades de antígeno D, 2-4 unidades de antígeno D (equivalente al 25-50% de la dosis estándar de 8 unidades de antígeno D) o alrededor o exactamente 3 unidades de antígeno D de IPV tipo 2 (equivalente a 37,5% de una dosis estándar de 8 unidades de antígeno D).

En otra forma de realización, la vacuna de la presente invención puede comprender aproximadamente o exactamente un tercio de una dosis estándar de 8 unidades de antígeno D de IPV tipo 2 (equivalente a aproximadamente 2,7 unidades de antígeno D).

- 30 En otra realización, las vacunas de la presente invención puede comprender 2-7 unidades de antígeno D de IPV tipo 2. En otra forma de realización, una dosis de la vacuna IPV de la presente invención puede comprender 3-6 unidades de antígeno D, o 4-5 unidades de antígeno D de IPV tipo 2.

Como alternativa, una dosis de la vacuna IPV de la presente invención puede comprender 2-4,5 unidades de antígeno D, 2,5-4 unidades de antígeno D o 3-3,5 unidades de antígeno D de IPV tipo 2.

- 35 En una forma de realización más, las vacunas de la presente invención puede comprender 8-20 unidades de antígeno D, más de 8 y menos de 20 unidades de antígeno D, 9-19 unidades de antígeno D, 10-18 unidades de antígeno D, 11-17 unidades de antígeno D, 12-16 unidades de antígeno D, o 13-15 unidades de antígeno D, por ejemplo alrededor de o exactamente 14 unidades de antígeno D de IPV tipo 3 (equivalentes al 25-62,5%, 28,125-59,375%, 31,25-46,875% o 43,75% de una dosis estándar de 32 unidades de antígeno D).

- 40 En otra forma de realización, la vacuna de la presente invención puede comprender aproximadamente o exactamente un tercio de una dosis estándar de 32 unidades de antígeno D de IPV tipo 3 (equivalente a aproximadamente 10,7 unidades de antígeno D).

- 45 En una forma de realización más, una dosis de la vacuna IPV de la presente invención puede comprender 8-29 unidades de antígeno D, 9-26 unidades de antígeno D, 10-23 unidades de antígeno D, 11-20 unidades de antígeno D, 12-17 unidades de antígeno D, o 13-14 unidades de antígeno D de IPV tipo 3.

Como alternativa, una dosis de la vacuna IPV de la presente invención puede comprender 8-19,5 unidades de antígeno D, 9-19 unidades de antígeno D, 10-18,5 unidades de antígeno D, 11-18 unidades de antígeno D, 12-17,5 unidades de antígeno D, 13-17 unidades de antígeno D, o 14-16 unidades de antígeno D; por ejemplo alrededor de o exactamente 15 unidades de antígeno D.

50 Componentes de la vacuna DTP

Las vacunas DTP son vacunas muy conocidas que se utilizan para prevenir o tratar la difteria, el tétanos y la enfermedad causada por *B. pertussis*. Las vacunas de la invención comprenden componente(s) de la difteria, el tétanos y/o pertussis.

El antígeno de la difteria es un toxoide diftérico. La preparación de los toxoides diftéricos (DT, por su sigla en inglés)

está bien documentada. Puede utilizarse cualquier toxoide diftérico. Por ejemplo, el DT puede producirse por la purificación de la toxina de un cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* seguido por una destoxificación química, pero como alternativa se produce por la purificación de un análogo recombinante o genéticamente destoxificado de la toxina (por ejemplo, CRM197, u otros mutantes como se describe en los documentos US 4.709.017, US 5.843.711, US 5.601.827 y US 5.917.017). En una forma de realización, el DT está presente en una cantidad de 5-50, 7-30 Lf o aproximadamente o exactamente 7,5 Lf o 25 Lf por dosis de 0,5 ml. En una forma de realización más, el DT está presente en una dosis baja de menos de 5 Lf, o 1-4 Lf o aproximadamente o exactamente 2 Lf por dosis de 0,5 ml. En una forma de realización, el toxoide diftérico puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el toxoide diftérico puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una forma de realización más, el toxoide diftérico puede ser adsorbido sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

El antígeno tetánico es un toxoide tetánico. Los procedimientos de preparación de toxoides tetánicos (TT) son muy conocidos en la técnica. En una forma de realización, el TT se produce por la purificación de la toxina de un cultivo de *Clostridium tetani* seguido por una destoxificación química, pero como alternativa se produce por la purificación de un análogo recombinante o genéticamente destoxificado de la toxina (por ejemplo, como se describe en el documento EP 209281). Puede utilizarse cualquier toxoide tetánico adecuado. El "toxoide tetánico" puede abarcar fragmentos inmunogénicos de la proteína de longitud total (por ejemplo, el fragmento C - véase el documento EP 478602). En una forma de realización, el TT está presente en una cantidad de 2,5-30 Lf, 3-20 Lf, 5-15 Lf) o exactamente o aproximadamente 10 Lf por dosis de 0,5 ml. En una forma de realización, el toxoide tetánico pueden ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el toxoide tetánico puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una forma de realización más, el toxoide tetánico puede ser adsorbido sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

El componente de pertussis puede ser acelular (Pa), en los casos en que se utilizan antígenos de pertussis purificados, o de células enteras (Pw), en los casos en que se utilizan células de pertussis enteras muertas como componente de pertussis. El componente Pw pueden ser inactivado por varios procedimientos conocidos, incluyendo los procedimientos sin mercurio. Tales procedimientos pueden incluir calor (por ejemplo, 55-65 °C o 56-60 °C, durante 50-60 minutos o durante 10-30 minutos, por ejemplo, 60 °C durante 30 minutos), formaldehído (por ejemplo, al 0,1% a 37 °C, 24 horas), glutaraldehído (por ejemplo, al 0,05% a temperatura ambiente, 10 minutos), acetona-I (por ejemplo, tres tratamientos a temperatura ambiente) o acetona-II (por ejemplo, tres tratamientos a temperatura ambiente y el cuarto tratamiento a 37 °C), inactivación (véase, por ejemplo, Gupta y col., 1987, J. Biol Stand 15:87; Gupta y col., 1986, Vaccine, 4:185). Los procedimientos de preparación de células enteras de *Bordetella pertussis* muertas (Pw) adecuadas para la presente invención se dan a conocer en el documento WO 93/24148, ya que son procedimientos de formulación adecuados para la producción de vacunas DT-TT-Pw-HepB. El tiomersal se ha utilizado en el pasado en la preparación de células enteras de *Bordetella pertussis* muertas (véase a continuación).

Típicamente se utiliza una dosis de Pw de 5-50 UIO, 7-40 UIO, 9-35 UIO, 11-30 UIO, 13-25 UIO, 15-21 UIO o alrededor de o exactamente 20 UIO.

Las vacunas acelulares Pa también son muy conocidas, y pueden comprender dos o más antígenos de: toxoide pertussis (PT, por su sigla en inglés), hemaglutinina filamentosa (FHA, por su sigla en inglés), pertactina (PRN), aglutinógenos 2 y 3. En una forma de realización, la vacuna Pa comprende PT, FHA y PRN. Los kits o las vacunas de la invención pueden comprender PT destoxificado por un procedimiento bien conocido de tratamiento con formaldehído o por medio de mutaciones (derivado de PT). Se ha encontrado que las sustituciones de residuos dentro de la subunidad S1 de la proteína da como resultado una proteína que mantiene sus propiedades inmunológicas y de protección del PT, pero con menor toxicidad o ausencia de toxicidad (documento EP 322533). Las mutaciones de destoxificación que se analizan en las reivindicaciones del documento EP322533 son ejemplos de los mutantes de DT destoxificados de la presente invención. Tales mutantes se pueden utilizar en dosis inferiores a 20-25 µg.

En una forma de realización, el PT se utiliza en una cantidad de 2-50 µg, 5-40 µg, 10-30 µg o exactamente o aproximadamente 25 µg por dosis de 0,5 ml. En otra forma de realización, el PT se usa en una cantidad de exactamente o aproximadamente 2,5 u 8 µg por dosis de 0,5 ml.

En una forma de realización, la FHA se utiliza en una cantidad de 2-50 µg, 5-40 µg, 10-30 µg o exactamente o aproximadamente 25 µg por dosis de 0,5 ml. En otra forma de realización, la FHA se utiliza en una cantidad de exactamente o aproximadamente 2,5 u 8 µg por dosis de 0,5 ml.

En una forma de realización, la PRN se utiliza en una cantidad de 0,5-20 µg, 0,8-15 µg, 2-10 µg o exactamente o aproximadamente 8 µg por dosis de 0,5 ml. En otra forma de realización, la PRN se utiliza en una cantidad de alrededor de o exactamente 0,8 o 2,5 µg por 0,5 ml.

En una forma de realización, el componente de pertussis puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el componente de pertussis puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una forma de realización más, el componente de pertussis puede ser

adsorbido sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Por ejemplo, en una forma de realización, al menos la PRN es adsorbida sobre hidróxido de aluminio con PT/FHA adsorbidos sobre hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o una mezcla de ambos.

Otros antígenos

5 Las formulaciones de vacunas de la invención, pueden comprender además uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en: antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno(s) de *Haemophilus influenzae* b, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* A, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* C, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* W-135, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* Y, vesículas de membrana externa o antígeno(s) purificados de *Neisseria meningitidis* B, antígeno(s) de hepatitis A, antígeno(s) de *Salmonella typhi* y RTS,S. Normalmente, pueden usarse antígenos de sacárido capsular o antígenos LOS de estos agentes patógenos. Los antígenos normalmente estarán presentes en una concentración de al menos 1 µg/ml de cada uno, por ejemplo, 1-20 µg/ml, 2-15 µg/ml, 2,5-10 µg/ml, 3-8 µg/ml o 4-6 µg/ml. En general, la concentración de cualquier antígeno será suficiente para provocar una respuesta inmunológica contra ese antígeno. Resulta de preferencia que la eficacia protectora de los antígenos individuales no se elimine por la combinación de los mismos, a pesar de que pueda verse reducida la inmunogenicidad real (por ejemplo, los valores de las pruebas de ELISA).

Los otros antígenos pueden, en una forma de realización de la invención, ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, los otros antígenos pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una forma de realización más, los otros antígenos pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, o pueden no someterse al proceso de adsorción.

En los casos en que se usa un antígeno de sacárido capsular o un antígeno LOS, el mismo puede ser conjugado con una proteína vehículo que comprende epítomos de células T ayudantes con el fin de mejorar la inmunogenicidad. La invención también puede comprender "proteínas vehículo" libres.

Como una alternativa al uso de antígenos proteicos en las composiciones que se dan a conocer en el presente documento, puede utilizarse el ácido nucleico que codifica el antígeno. Los componentes proteicos de las composiciones de la invención pueden, por consiguiente, ser reemplazados por el ácido nucleico (por ejemplo ADN, que puede estar en forma de un plásmido) que codifica la proteína. De manera similar, tales composiciones pueden comprender proteínas que imitan los antígenos de sacáridos, por ejemplo, mimótopos o anticuerpos anti-idiotipo. Estos pueden reemplazar a los componentes individuales de sacáridos, o pueden complementarlos.

30 Antígeno de hepatitis B

La preparación del antígeno de superficie de la hepatitis B (AgHBs) está bien documentada.

Véase, por ejemplo, Hartford y col., 1983, *Develop. Biol. Standard* 54:125, Gregg y col., 1987, *Biotechnology* 5: 479, documentos EP0226846, EP0299108. Se puede preparar de la siguiente manera. Un procedimiento implica la purificación del antígeno en forma de partículas a partir del plasma de portadores de hepatitis B crónica, ya que en el hígado se sintetizan grandes cantidades de AgHBs y se liberan al torrente sanguíneo durante una infección por el VHB. Otro procedimiento implica la expresión de la proteína por medio de procedimientos de ADN recombinante. El AgHBs se puede preparar por medio de la expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en *Pichia*, en células de insectos (por ejemplo, Hi5) o células de mamífero. El AgHBs puede insertarse en un plásmido, y su expresión a partir del plásmido puede ser controlada por un promotor tal como el promotor "GAPDH" (del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). La levadura puede cultivarse en un medio sintético. El AgHBs puede purificarse a continuación por un proceso que incluye etapas tales como la precipitación, la cromatografía de intercambio iónico y la ultrafiltración. Después de la purificación, puede someterse el AgHBs a un procedimiento de diálisis (por ejemplo, con cisteína). El AgHBs se pueden utilizar en forma de partículas.

Según se utiliza en el presente documento, la expresión "antígeno de superficie de la hepatitis B" o "AgHBs" incluye cualquier antígeno AgHBs o fragmento del mismo que presente la antigenicidad del antígeno de superficie del VHB. Se entenderá que, además de la secuencia de 226 aminoácidos del antígeno S de AgHBs (véase Tiollais y col., 1985, *Nature* 317: 489 y sus referencias), AgHBs según se describe en el presente documento, si se desea, contiene toda o parte de una secuencia pre-S como se describe en las referencias anteriores y en el documento EP0278940. En particular, el AgHBs puede comprender un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 133-145 seguida por los residuos 175-400 de la proteína L de AgHBs con relación al marco de lectura abierto en un virus de hepatitis B del serotipo ad (este polipéptido se conoce como L*, véase el documento EP0414374). El AgHBs puede también incluir el polipéptido preS1-preS2-S descrito en el documento EP 0198474 (Endotronics) o análogos del mismo, tales como los descritos en el documento EP 0304578 (Mc Cormick and Jones). AgHBs, tal como se describe en el presente documento, puede referirse también a mutantes, por ejemplo, el "mutante de escape" descrito en el documento WO 91/14703 o en el documento EP 0511855A1, especialmente el AgHBs en el que la sustitución del aminoácido en la posición 145 es de glicina por arginina.

El AgHBs puede estar en forma de partículas. Las partículas pueden comprender, por ejemplo, proteína S sola o

pueden estar formadas por partículas compuestas, por ejemplo (L*, S), en las que L* es tal como se ha definido anteriormente y S indica la proteína S del AgHBs. De manera ventajosa, dicha partícula se encuentra en la forma en que se expresa en la levadura.

5 En una forma de realización, el AgHBs es el antígeno usado en EngerixB™ (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), que se describe más en el documento WO93/24148.

En una forma de realización, el AgHBs está presente en una cantidad de 5-20 µg, 8-15 µg, o aproximadamente o exactamente 10 µg por dosis de 0,5 ml.

10 El antígeno de superficie de la hepatitis B puede ser adsorbido sobre fosfato de aluminio, procedimiento que se puede realizar antes de mezclarlo con los otros componentes (descrito en el documento WO93/24148). El componente de hepatitis B debe estar sustancialmente libre de tiomersal (el procedimiento de preparación de AgHBs sin tiomersal se ha publicado previamente en el documento EP 1307473).

Antígeno(s) de *Haemophilus influenzae* b

15 Las vacunas que comprenden antígenos de *Haemophilus influenzae* tipo B se han descrito en el documento WO 97/00697. Las vacunas de la invención pueden utilizar cualquier antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo B adecuado. El antígeno puede ser un sacárido capsular (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) conjugado con una proteína vehículo. El sacárido es un polímero de ribosa, ribitol y fosfato. El antígeno Hib opcionalmente pueden ser adsorbido sobre fosfato de aluminio como se describe en el documento WO 97/00697, o puede no estar adsorbido como se describe en el documento WO 02/00249 o puede no someterse a un proceso de adsorción específico.

20 En el presente documento se entiende por antígeno “no adsorbido en una sal de aluminio adyuvante”, por ejemplo, que en el proceso de formulación de la composición no está incluida una etapa de adsorción expresa o dedicada para el antígeno sobre una sal adyuvante de aluminio recién preparada.

25 Hib se puede conjugar con cualquier vehículo que pueda proporcionar al menos un epítipo de célula T ayudante (ejemplos de los cuales se describen a continuación), y puede ser el toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM-197 (mutante de la toxina diftérica) o la proteína D.

Hib se puede liofilizar y puede reconstituirse de manera extemporánea (por ejemplo, con diluyente, que opcionalmente comprenda otros componentes antigénicos de las vacunas de la invención).

En una forma de realización, el antígeno Hib está presente en una cantidad de 5-20 µg, 8-15 µg, o aproximadamente o exactamente 10 µg de sacárido por dosis de 0,5 ml.

30 En una forma de realización más, el Hib está presente en una dosis baja (por ejemplo, 1-6 µg, 2-4 µg o alrededor de o exactamente 2,5 µg de sacárido) como se describe en el documento WO 02/00249.

Antígenos de *Neisseria meningitidis* tipos A, C, W o Y

35 Las vacunas de la invención pueden comprender además un sacárido capsular de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *N. meningitidis* tipo A (MenA, opcionalmente conjugado con una proteína vehículo), *N. meningitidis* tipo C (MenC, opcionalmente conjugado con una proteína transportadora), *N. meningitidis* tipo W-135 (MenW, opcionalmente conjugado con una proteína vehículo) y *N. meningitidis* tipo Y (MenY, opcionalmente conjugado con una proteína vehículo).

40 Las vacunas de la invención puede comprender uno o más antígenos de diferentes cepas de *N. meningitidis*, que puede utilizarse solos o en cualquier combinación de dos, tres o cuatro componentes como se detalla a continuación:

MenA, MenC, MenW, MenY o MenA + MenC, MenA + MenW, MenA + MenY, MenC + MenW, MenC + MenY, MenW + MenY o MenA + MenC + MenW, MenA + MenC + MenY, MenA + MenW + MenY, MenC + MenW + MenY o MenA + MenC + MenW + MenY.

45 En una forma de realización, el (los) componente(s) de *Neisseria meningitidis* pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el (los) componente(s) de *Neisseria meningitidis* pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una forma de realización más, el (los) componente(s) de *Neisseria meningitidis* pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En una forma de realización, el (los) componente(s) de *Neisseria meningitidis* pueden no estar adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio adyuvante.

50 Antígeno(s) o vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B

Las vacunas de la invención también puede comprender un componente de MenB tal como una vesícula o ampolla de membrana externa como se describe en los documentos WO 01/09350, WO 03/105890, WO 04/014417 o WO

04/014418 o un antígeno sacárido capsular de MenB conjugado (o derivado del mismo) (por ejemplo, véase documento WO 96/40239) o un LOS meningocócico L2 o L3 o L2 y L3 libre o conjugado (según el documento WO 2004/014417). En una forma de realización, el (los) componente(s) de MenB pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el (los) componente(s) de MenB pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una forma de realización más, el (los) componente(s) de MenB pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En una forma de realización, el (los) componente(s) de MenB pueden no estar adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio adyuvante.

Antígeno(s) de *Salmonella typhi*

10 Las vacunas de la invención pueden comprender además el sacárido Vi de *Salmonella typhi*, que puede ser el producto registrado Typherix®, que se describe en el documento EP 1107787, o un conjugado del mismo (por ejemplo, con una proteína vehículo, como se describe en el presente documento). El proceso de conjugación puede llevarse a cabo como se describe en el documento WO 2007/000343. En una forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En una forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden no estar adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio adyuvante.

Antígeno(s) de la hepatitis A

20 El componente que da la protección contra la hepatitis A puede ser una vacuna atenuada inactivada de hepatitis A, por ejemplo el producto conocido como Havrix™ (marca registrada de Glaxo SmithKline Biologicals S.A.), que es una vacuna atenuada inactivada derivada de la cepa HM-175 del virus de hepatitis A (VHA) (véase "Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A" por F.E. Andre y col., 1980, Prog. Med. Virol. 37:72 y la monografía del producto "Havrix", publicada por SmithKline Beecham Biologicals, 1991). Flehmig y col. (1990, Prog. Med. Virol. 37:56) han revisado los aspectos clínicos, la virología, la inmunología y la epidemiología de la hepatitis A y analizaron enfoques sobre los desarrollos de vacunas contra esta infección viral común. Según se utiliza en el presente documento, la expresión "antígeno del VHA" se refiere a cualquier antígeno capaz de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes contra el VHA en los seres humanos. En una forma de realización, el antígeno del VHA comprende partículas virales atenuadas inactivadas, o en otra forma de realización puede ser una cápside del VHA o una proteína viral del VHA, que se puede obtener de manera conveniente mediante tecnología de ADN recombinante. En una forma de realización, el componente de hepatitis A pueden ser adsorbido sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el componente de hepatitis A puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, el componente de hepatitis A puede ser adsorbido sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

Antígeno(s) de la malaria

Las vacunas de la invención pueden comprender además antígeno(s) de agentes que causan la malaria. El antígeno de la malaria puede ser RTS,S (proteína híbrida entre CS y AgHBs - descrita en los documentos US 6.306.625 y EP 0614465). En una forma de realización, puede utilizarse RTS,S en las vacunas de la invención en el lugar de AgHBs. También pueden utilizarse otros antígenos de la malaria en las vacunas de la invención, incluyendo la proteína CS, RTS, TRAP, proteína de 16kD de B 2992, AMA-1, MSP1, incluyendo opcionalmente CpG (documentos WO 2006/029887, WO 98/05355, WO 01/00231).

En una forma de realización, el (los) antígeno(s) de la malaria pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el (los) antígeno(s) de la malaria pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una forma de realización más, el (los) antígeno(s) de la malaria pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En una forma de realización, el antígeno de la malaria se une a un adyuvante formado por una emulsión de aceite en agua y/o un derivado de lípido A (tal como MPL) y/o un esteroide (tal como colesterol) y/o un tocol (por ejemplo, α -tocoferol). En otra forma de realización, el (los) antígeno(s) de la malaria pueden no estar adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio adyuvante.

Conjugados

Los conjugados de sacáridos capsulares bacterianos adecuados para la invención pueden comprender cualquier péptido, polipéptido o proteína vehículo que comprenda al menos un epítipo de célula T ayudante. La(s) proteína(s) vehículo se pueden seleccionar del grupo que consiste en: toxoide tetánico, toxoide diférico, CRM 197, toxina recombinante de la difteria (como se describe en cualquiera de los documentos US 4.709.017, WO 93/25210, WO 95/33481 o WO 00/48638), neumolisina (opcionalmente destoxificada por medios químicos, o un mutante destoxificado) de *S. pneumoniae* (véase, por ejemplo documento WO 2004/081515 y las referencias que en figuran en el mismo), OMPC de *N. meningitidis* (documento EP 0372501) y proteína D (PD) de *H. influenzae* (documento EP 594610). Otros vehículos pueden incluir péptidos sintéticos (documentos EP 0378881, EP 0427347), proteínas de

choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668, EP 0471177), citocinas (documento WO 91/01146), linfocinas (documento WO 91/01146), hormonas (documento WO 91/01146), factores de crecimiento (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprende múltiples epítopos de células T CD4⁺ humanas de diversos antígenos derivados de agentes patógenos (Falugi y col., 2001, Eur. J. Immunol. 31: 3816), proteína de superficie neumocócica PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), PhtD de neumococo (documento WO 00/37105), PhtDE de neumococo (por ejemplo, documentos WO 01/98334 y WO 03/054007), PhtX, etc.

Los sacáridos pueden estar todos en el mismo vehículo, en especial todos los sacáridos de un organismo en particular, por ejemplo, los sacáridos de MenA, MenC, MenW y MenY se pueden conjugar todos con TT, DT o CRM 197. Sin embargo, debido al conocido efecto de supresión del vehículo, puede ser ventajoso que en cada una de las composiciones de la invención los antígenos sacáridos contenidos en la misma ("n" antígenos) se conjuguen con más de un vehículo. Por lo tanto, (n-1) de los sacáridos podrían ser transportados (por separado) en un tipo de vehículo, y 1 en un vehículo diferente, o (n-2) en uno, y dos en dos vehículos diferentes, etc. Por ejemplo, en una vacuna que contiene cuatro conjugados de sacáridos bacterianos, 1, 2 o los cuatro pueden conjugarse con diferentes vehículos). La proteína D, sin embargo, puede utilizarse para diversos (2, 3, 4 o más) sacáridos en una composición sin que se produzca un marcado efecto de supresión del vehículo. Hib puede estar presente como un conjugado con TT, DT o CRM197, y MenA, MenC, MenY y MenW pueden estar como conjugados con TT, DT, CRM197 o PD. Vi puede estar presente como un conjugado con TT, DT o CRM197. La proteína D es un vehículo útil, ya que proporciona un antígeno adicional que puede proporcionar protección frente a *H. influenzae*. En una forma de realización, todos los sacáridos se conjugan con la misma proteína vehículo.

Vi puede conjugarse con una proteína vehículo, por ejemplo, por un procedimiento que utiliza química condensación con carbodiimida (por ejemplo, EDAC) (dado que la subunidad de repetición Vi comprende grupos ácido carboxílico). Esto se podría lograr, ya sea por (i) una única reacción de carbodiimida entre el COOH de Vi y el NH₂ de la proteína o (ii) una doble reacción de carbodiimida que puede tener lugar ya sea entre el COOH de Vi y el NH₂ de una molécula conectora homobifuncional y el COOH de la proteína y el NH₂ de la molécula conectora homobifuncionales, o entre el COOH de Vi y el NH₂ de la molécula conectora heterobifuncional y el NH₂ de la proteína y el COOH de la molécula conectora heterobifuncional.

La conjugación puede usarse conjuntamente con la(s) proteína(s) vehículo libre(s). En una forma de realización, cuando está presente una proteína vehículo dada tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada no constituye más del 5% de la cantidad total de la proteína vehículo en la composición como un todo, o en otra forma de realización está presente en una cantidad inferior al 2% en peso.

El sacárido puede unirse a la proteína vehículo por cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, por Likhite, Patente de EEUU 4.372.945 y por Armor y col., Patente de EEUU 4.474.757), con cualquier conector adecuado cuando sea necesario.

El sacárido normalmente será activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, agentes de cianilación tales como CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridinio) documentos (WO 95/08348 y WO 96/29094). La reacción de cianilación puede realizarse bajo condiciones relativamente suaves, que evitan la hidrólisis de los sacáridos sensibles a la alcalinidad. Esta síntesis permite un acoplamiento directo con una proteína vehículo. Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC o TSTU.

Las uniones a través de un grupo conector pueden realizarse por medio de cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en los documentos US 4.882.317 y US 4.695.624. Un tipo de unión implica la aminación reductora del sacárido, el acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo conector de ácido adípico (documento EP 0477508, Porro y col., 1985, Mol. Immunol. 22: 907, documento EP 0208375), y a continuación el acoplamiento de una proteína al otro extremo del grupo conector de ácido adípico. Otros conectores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever y col., 1979, Med. Microbiol. Immunol. 165: 171), haluros de haloacilo (documento US 4.057.685), enlaces glucosídicos (documentos US 4.673.574; US 4.761.283; US 4.808.700), ácido 6-aminocaproico (documento US 4.459.286), ADH (documento US 4.965.338), restos C4 a C12 (US 4.663.160), etc. Como una alternativa al uso de un conector, puede utilizarse el enlace directo. Los enlaces directos con la proteína puede comprender la oxidación del sacárido seguida por la aminación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo en los documentos US 4.761.283 y US 4.356.170 o una reacción directa con CDAP.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Existen muchos procedimientos adecuados para la separación, incluyendo la cromatografía hidrófoba, la ultrafiltración tangencial, la diafiltración, etc. (véase también Lei y col., 2000, Dev Biol (Basilea) 103: 259; documentos WO 00/38711; US 6.146.902). En una forma de realización, si una vacuna comprende un sacárido dado tanto en forma libre como conjugada, la forma no conjugada no constituye más que el 20% en peso de la cantidad total de tal sacárido en la composición como un todo (por ejemplo, ≤ 15%, ≤ 10%, ≤ 5%, ≤ 2%, ≤ 1%).

La cantidad de sacárido que es capaz de conferir protección a un huésped (una cantidad eficaz) puede ser determinada por el experto. En una forma de realización, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de sacárido, en otra forma de realización cada dosis comprenderá de 0,1 a 50 µg, en una forma de realización más, cada dosis comprenderá de 0,1 a 10 µg, en otra forma de realización más, cada dosis comprenderá de 1 a 5 µg.

5 Adyuvantes

Las vacunas de la invención puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un adyuvante adecuado. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como el hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, o puede ser un sacárido catiónicamente o aniónicamente derivatizado, polifosfacenos, 10 microsferas biodegradables, monofosforil lípido A (MPL), derivados de lípido A (por ejemplo, de toxicidad reducida), MPL 3-O-desacilado, quil A, saponina, QS21, tocol (documento EP 0382271), adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), AS-2 (Smith-Kline Beecham, Philadelphia, PA), oligonucleótidos CpG, bioadhesivos y mucoadhesivos, micropartículas, liposomas, 15 formulaciones de éteres de polioxietileno, formulaciones de ésteres de polioxietileno, péptidos de muramilo o compuestos de imidazoquinolona (por ejemplo, imiquamod y sus homólogos). Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), también se pueden utilizar como adyuvantes el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulante de colonias de granulocitos, macrófagos (GM-CSF).

20 En una forma de realización de la invención, la composición adyuvante de las formulaciones induce una respuesta inmunitaria predominantemente del tipo de TH1. Altos niveles de citocinas del tipo TH1 (por ejemplo, IFN-γ, TNFα, IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno administrado. En una forma de realización, en la que la respuesta es predominantemente de tipo TH1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas 25 citocinas pueden evaluarse fácilmente mediante ensayos convencionales. Para una revisión de las familias de citocinas, véase Mosmann and Coffman, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7: 145.

Por consiguiente, los sistemas adyuvantes adecuados que promueven una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, derivados del lípido A (por ejemplo, de toxicidad reducida), monofosforil lípido A (MPL) o uno de sus 30 derivados, particularmente monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL), y una combinación de monofosforil lípido A, opcionalmente monofosforil lípido A 3-de-O-acilado junto con una sal de aluminio. Un mejor sistema implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, en particular la combinación de QS21 y 3D-MPL, como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se inactiva con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el 35 documento WO 95/17210. La vacuna puede comprender además una saponina, que puede ser QS21. La formulación también puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol (documento WO 95/17210). Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilada (documentos WO 96/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son adecuados para su uso en la presente invención.

Las vacunas de la invención también pueden comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los 40 adyuvantes mencionados anteriormente.

Cualquier adyuvante puede ser adsorbido por o combinado con el componente IPV de la invención.

Al referirse a hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, se hace referencia a todos los adyuvantes de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio como están descritos por Hem and White (Pharm. Biotechnol 1995; 6: 249-276).

45 En una forma de realización, también se puede hacer referencia al fosfato de aluminio como hidroxifosfato de aluminio. En otra realización, el fosfato de aluminio tiene una carga negativa a un pH de 7,4. Por lo general, el punto isoelectrico (pi) del fosfato de aluminio es de 5 a 7 o 6 a 7 o de alrededor de o exactamente 5. En una forma de realización más, el fosfato de aluminio tiene una relación molar de fosfato : aluminio de 0,3 a 0,9 o de 0,3 a 0,6 o de 0,8 a 0,9.

50 En una forma de realización, el hidróxido de aluminio tiene una carga positiva a un pH de 7,4. Por lo general, el pi del hidróxido de aluminio es de 8 a 11, 9 a 11, 10 a 11 o alrededor de o exactamente 11.

Por lo general, el contenido total de aluminio es de 200 a 1000 µg, 300 a 900 µg, 400 a 800 µg, 500 a 700 µg o de 55 alrededor de o exactamente 630 µg Al³⁺ por dosis de 0,5 ml. Esto puede ser todo hidróxido de aluminio o todo fosfato de aluminio. Como alternativa, el contenido de Al³⁺ puede ser de una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio en la siguiente relación: 1:8 - 8:1, 1:4 - 4:1, 3:8 - 8:3, 1:2 - 2:1 o 1:1 de fosfato de aluminio : hidróxido de aluminio. En una forma de realización, se utiliza una relación de 12:1 - 4:1, 11:1 - 5:1, 10:1 - 6:1, 9:1 - 7:1 u 8:1 de fosfato de aluminio : hidróxido de aluminio.

Aunque la mayor parte de aluminio es proporcionada por los antígenos preadsorbidos antes de la mezcla para

formar una vacuna de combinación, algo de aluminio se pueden añadir en forma libre durante la formulación de la vacuna de combinación de la invención, por ejemplo, antes de la etapa de ajuste del pH que se describe en el presente documento. Por lo general, el contenido de aluminio libre por dosis de 0,5 ml puede ser de 0 a 300 µg, de 50 a 250 µg, de 75 a 200 µg, de 100 a 154 µg o de alrededor de o exactamente 115 µg de Al³⁺. El Al³⁺ libre puede ser todo Al(OH)₃ o todo AlPO₄, o una mezcla de Al(OH)₃ y AlPO₄ en la siguiente relación (Al³⁺ : Al³⁺ p:p): 1:1 – 1:6, 1:1,1 – 1:5, 1:1,2 – 1:4, 1:1,3 – 1:3, 1:1,4 – 1:2, por ejemplo, 23/92 o 69/46 o 6:1 – 1:1, 5:1 – 1,1:1, 4:1 – 1,2:1, 3:1 – 1,3:1, 2:1 – 1,4:1, por ejemplo, 46/69 o 92/23.

Como alternativa, ciertos componentes de las vacunas de la invención pueden no ser adsorbidos en forma expresa sobre un adyuvante, en particular, las sales de aluminio.

El IPV puede no estar adsorbida o puede estar adsorbida a Al(OH)₃, o a una mezcla de Al(OH)₃ y AlPO₄. El DT puede estar adsorbido sobre Al(OH)₃ o AlPO₄, el TT puede estar adsorbido sobre Al(OH)₃ o AlPO₄, el Pw puede estar adsorbido sobre o mezclado con AlPO₄, la PRN pueden estar adsorbida sobre Al(OH)₃, la FHA pueden estar adsorbida sobre Al(OH)₃, el PT puede estar adsorbido sobre Al(OH)₃, el HB puede estar adsorbido sobre AlPO₄, el Hib puede estar adsorbido sobre AlPO₄ o puede no estar adsorbido, Men ACWY pueden estar adsorbidos sobre Al(OH)₃ o AlPO₄ o pueden no estar adsorbidos, el componente MenB puede estar adsorbidos sobre Al(OH)₃ o AlPO₄ o puede no estar adsorbido, el Vi puede estar adsorbido sobre Al(OH)₃ o AlPO₄ o puede no estar adsorbido, el HepA puede estar adsorbido sobre Al(OH)₃ o AlPO₄.

Los antígenos que están preadsorbidos sobre una sal de aluminio se pueden preadsorber de manera individual antes de la mezcla. En otra forma de realización, puede preadsorberse una combinación de antígenos antes de mezclarlos con otros adyuvantes. En una forma de realización, el IPV pueden ser absorbido por separado o como una mezcla de IPV de tipos 1, 2 y 3, o cuando se mezcla con los componentes de D y T adsorbidos.

El significado de la expresión “antígeno adsorbido” se entiende, por ejemplo, como más del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% absorbido.

El significado de las expresiones “fosfato de aluminio” e “hidróxido de aluminio”, como se utilizan en el presente documento, incluye todas las formas de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio que son adecuadas para actuar como adyuvantes de vacunas. Por ejemplo, el fosfato de aluminio puede ser un precipitado de fosfato de aluminio insoluble (amorfo, semicristalino o cristalino), que puede prepararse opcionalmente, pero no exclusivamente, mezclando sales solubles de aluminio y sales de ácido fosfórico. El “hidróxido de aluminio” puede ser un precipitado de hidróxido de aluminio insoluble (amorfo, semicristalino o cristalino), que pueden prepararse opcionalmente, pero no exclusivamente, por neutralización de una disolución de sales de aluminio. Especialmente adecuadas son las diversas formas de geles de hidróxido de aluminio y de fosfato de aluminio disponibles en el mercado, por ejemplo, Alhydrogel (hidróxido de aluminio, suspensión al 3% en agua) y Adjuphos (fosfato de aluminio, suspensión al 2% en disolución salina) suministrados por Brenntag Biosector (Dinamarca).

Componentes no inmunológicos de las vacunas de la invención

Las vacunas de la invención comprenderán típicamente, además de los componentes antigénicos y adyuvantes que se mencionaron anteriormente, uno o más “vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables”, que incluyen cualquier excipiente que no induzca la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los excipientes adecuados son típicamente macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col., 2001, Vaccine, 19: 2118), trehalosa (documento WO 00/56365), agregados de lactosa y lípidos (tales como gotículas de aceite o liposomas). Tales vehículos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, disolución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsivos, sustancias tamponadoras del pH, y similares. La disolución salina fisiológica tamponada de fosfato, estéril, libre de pirógenos es un vehículo típico. Una discusión completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN: 0683306472.

Las composiciones de la invención puede estar liofilizadas o en forma acuosa, es decir, como disoluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas de este tipo permiten administrar las composiciones directamente desde sus formas de presentación, sin la necesidad de reconstitución en un medio acuoso, por lo que son ideales para la inyección. Las composiciones se pueden presentar en viales, o se pueden presentar en jeringas precargadas listas para usar. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una sola dosis o varias dosis (por ejemplo, 2 dosis). En una forma de realización, la dosis es para seres humanos. En otra forma de realización, la dosis es para un ser humano adulto, adolescente, niño, niño pequeño o bebé menor de un año de edad y puede ser administrada por inyección.

Las vacunas líquidas de la invención también son adecuadas para la reconstitución de otras vacunas a partir de una forma liofilizada. En el caso de que una vacuna se vaya a utilizar para reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, que puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa precargada lista para usar y

un vial, siendo el contenido de la jeringa el que se utiliza para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección.

Las vacunas de la invención pueden envasarse en forma de monodosis o en forma de dosis múltiples (por ejemplo, 2 dosis). Para las formas de dosis múltiples, resultan de preferencia los viales a las jeringas precargadas. Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de manera rutinaria, pero la dosis típica para seres humanos de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

En una forma de realización, las vacunas de la invención tienen un pH de entre 6,0 y 8,0, en otra forma de realización, las vacunas de la invención tienen un pH de entre 6,3 y 6,9, por ejemplo, $6,6 \pm 0,2$. Las vacunas pueden tamponarse en este pH. El pH puede mantenerse estable por medio del uso de un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se puede utilizar un tampón de histidina (documento WO 03/009869). La composición debe ser estéril y/o libre de pirógenos.

Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las vacunas de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasan en un formato de múltiples dosis. Se debe evitar el uso de tiomersal ya que éste da lugar a la pérdida de potencia del componente de IPV. Pueden utilizarse otros antimicrobianos, tales como 2-fenoxietanol o parabenos (metil, etil, propilparabenos). La presencia de cualquier conservante será de preferencia en niveles bajos. El conservante puede añadirse de manera exógena y/o puede ser un componente de los antígenos a granel que se mezclan para formar la composición (por ejemplo, presente como conservante en los antígenos de pertussis).

Las vacunas de la invención están libres de tiomersal o están sustancialmente libres de timerosal. Por "libre de tiomersal" o "sustancialmente libre de timerosal" se entiende que no hay suficiente tiomersal presente en la formulación final para que tenga un efecto negativo en la potencia del componente de IPV. Por ejemplo, si el tiomersal se utiliza durante el proceso de purificación de Pw o del antígeno de superficie de la hepatitis B, debe ser prácticamente eliminado antes de la mezcla con el IPV. El contenido de tiomersal en la vacuna final debe ser inferior a 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína, 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína, 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína o 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína, por ejemplo, 0 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína. En una forma de realización, no se añade ni se utiliza tiomersal en la purificación de ningún componente. Véase, por ejemplo el documento EP1307473 para la hepatitis B y véase anteriormente para los procesos de Pw en los que se logra la inactivación en ausencia de tiomersal.

Las vacunas de la invención pueden comprender un detergente, por ejemplo un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes, por lo general, están presentes en niveles bajos, por ejemplo $<0,01\%$.

Las vacunas de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. La composición puede comprender cloruro de sodio. En una forma de realización, la concentración de cloruro de sodio en la composición de la invención está en el intervalo de 0,1 a 100 mg/ml (por ejemplo, 1-50 mg/ml, 2-20 mg/ml, 5-15 mg/ml) y en otra forma de realización, la concentración de cloruro de sodio es de NaCl 10 ± 2 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml.

Las vacunas de la invención incluirán, por lo general, un tampón. Es típico un tampón de fosfato o histidina.

Las vacunas de la invención pueden incluir iones fosfato libres en la disolución (por ejemplo, por el uso de un tampón de fosfato) con el fin de favorecer la no adsorción de los antígenos. La concentración de iones fosfato libres en la composición de la invención está, en una forma de realización, entre 0,1 y 10,0 mM, o en otra forma de realización, entre 1 y 5 mM, o en una forma de realización más es de aproximadamente 2,5 mM.

Propiedades de las vacunas de la invención

En una forma de realización, las vacunas de la invención se formulan como una vacuna para administración in vivo al receptor de tal manera que los componentes individuales de la composición se formulan para que la inmunogenicidad de los componentes individuales que no se vea afectada sustancialmente por otros componentes de la composición. Por no afectado sustancialmente, se entiende que tras la inmunización se obtiene un valor de anticuerpos contra cada componente que es más del 60%, 70%, 80% o 90%, o del 95 al 100% del valor obtenido cuando se administra el antígeno de manera aislada. Por consiguiente, en formas de realización de preferencia, no se produce ningún efecto (significativamente) perjudicial a los otros componentes (en términos de eficacia protectora) en la combinación, en comparación con su administración de forma aislada.

Formulaciones de vacuna

En una forma de realización, las vacunas de la invención se formulan como una vacuna para administración in vivo al receptor, de tal manera que confieran un valor o título de anticuerpos superior al criterio de seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de los seres humanos. Esta es una prueba importante en la evaluación de la eficacia de la vacuna en la población. Los antígenos con un valor de anticuerpos asociados por encima del cual se considera que un receptor ha alcanzado la seroconversión contra el antígeno son muy conocidos, y tales valores están publicados por organizaciones tales como la OMS. En una forma de realización, más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión, en otra forma de realización,

del 90% de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión, en una forma de realización más, más del 93% de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión y en aún otra forma de realización más, del 96 al 100% de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión.

- 5 La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos de las vacunas típicas. Tal cantidad variará en función de los inmunógenos específicos que se utilicen. En general, se espera que cada dosis comprenda de 1 a 1000 µg de inmunógeno total, o de 1 a 100 µg, o de 1 a 40 µg, o de 1 a 5 µg. Una cantidad óptima para una vacuna particular puede ser determinada por medio de estudios que implican la observación de los valores de anticuerpos y otras respuestas en los sujetos. Un ciclo primario de vacunación pueden incluir de 2 a 3 dosis de la vacuna, con administraciones separadas por uno o dos meses, por ejemplo, siguiendo las recomendaciones de la OMS para la vacunación DTP (es decir, en el primer año de vida). Las dosis de refuerzo puede continuar en el segundo año y/o en años posteriores de la vida.

Potencia de poliovirus medida por la prueba de seroneutralización en ratas

- 15 A los efectos de la invención, el ensayo para la evaluación cuantitativa de la potencia de la vacuna IPV de las vacunas que contienen IPV de la invención debe realizarse utilizando una sola dosis de la vacuna y debe hacerse por medio de la determinación de la relación de la media geométrica del valor (MGV) de la vacuna de prueba a la MGV de la vacuna de referencia, y se presenta como la respuesta relativa (RR) o la potencia relativa (PR). La MGV de referencia puede ser la MGV obtenida con cualquier vacuna IPV que comprenda 40-8-32 unidades de antígeno D de IPV de tipos 1-2-3, respectivamente, y puede ser la MGV obtenida con la vacuna conocida Poliorix®. Por lo general, la prueba de PR se lleva a cabo de la siguiente manera:

La potencia de los poliovirus tipo 1, 2 y 3 se determinó en ratas por seroneutralización:

- 25 Se inocularon grupos de 10 ratas sanas (Sprague-Dawley (OFA) o cualquier otra cepa validada de antemano) por vía intramuscular con diluciones (1/1,25; 1/3,125; 1/7,81) de las muestras de prueba o el material de referencia en disolución salina con tampón de fosfato. De ser necesario, se puede extender el intervalo de dilución hasta cuatro diluciones mediante la inoculación de la vacuna sin diluir y las tres diluciones mencionadas anteriormente. Como controles negativos se utilizaron diez ratas inoculadas con el diluyente. Las ratas se observaron una vez por semana para detectar cualquier reacción anormal. De 20 a 22 días después de la inoculación, se anestesiaron los animales profundamente, se les extrajo la sangre y se recogió el suero para analizarlo mediante la prueba de seroneutralización.

Para la prueba de seroneutralización, los sueros se inactivaron por incubación a 56 °C durante 30 minutos en un baño de agua. Se prepararon tres series de diluciones de los sueros, una para cada tipo de polio, en microplacas utilizando el medio de dilución adecuado. Las placas se almacenaron a +4 °C.

- 35 Para los tres tipos de virus de la polio, se añadió una determinada cantidad de virus (30-300 CCID₅₀) a las diluciones de los sueros. Las tres suspensiones de virus se diluyeron teniendo en cuenta sus valores respectivos. La dilución final se denomina "dilución de trabajo". Se añadió cada dilución de trabajo a las microplacas correspondientes. A continuación se sellaron las placas y se incubaron a 37 °C ± 1 °C durante 16 horas. A continuación se añadieron células Hep-2 y se incubaron las microplacas a 37 °C ± 1 °C durante 7 días. El efecto citopatogénico (ECP) del virus se determinó mediante un microscopio invertido tras realizar la tinción con azul de Coomassie. La presencia de anticuerpos antipoliomielitis inhibe el crecimiento del virus y la aparición del correspondiente ECP. Los valores de anticuerpos anti-virus de la poliomiélitis (tipos 1, 2 y 3) corresponden a la inversa de la última dilución sin ningún tipo de ECP. En cada grupo, se registraron los animales con anticuerpos neutralizantes y se determinaron los valores de anticuerpos de cada muestra de suero para los diferentes tipos de poliovirus. El valor de anticuerpos neutralizantes se expresó como el log₂ de la inversa de la mayor dilución de la muestra de suero que inhibía totalmente el efecto citopático del virus de la polio en células Hep-2.

También se determinó la media geométrica del valor (MGV) por dilución y por tipo de virus para cada grupo de ratas.

Presentación de las vacunas de la invención

- 50 Las vacunas de la invención pueden envasarse en diferentes tipos de recipientes, por ejemplo en viales, en jeringas, etc. Un vial multidosis típicamente comprenderá un puerto de plástico con precinto que puede volver a cerrarse herméticamente a través del cual se puede insertar una aguja estéril para extraer una dosis de la vacuna, que vuelve a cerrarse una vez que la aguja se ha retirado.

- 55 La vacuna puede suministrarse en diversos recipientes (por ejemplo, 2 o 3). El contenido de los recipientes puede ser mezclado de manera extemporánea antes de administrarlo a un receptor en una sola inyección o puede ser administrado de forma concomitante en sitios diferentes. La dosis de la vacuna o cada vacuna, si se administra un kit de manera concomitante (en dos o más recipientes), por lo general será de 0,5 ml.

En una forma de realización de este aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende dos vacunas

multivalentes para conferir protección a un receptor contra la enfermedad causada por el poliovirus, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y, opcionalmente, uno o más de hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, hepatitis A o malaria.

5 El kit comprende un primer recipiente que comprende:

(1)

(a) virus de la polio inactivados (IPV) de la invención,

(b) toxoide diftérico (DT o D) (véase anteriormente),

(c) toxoide tetánico (TT o T) (véase anteriormente),

10 (d) células enteras muertas de *Bordetella pertussis* (Pw) o 2 o más componentes acelulares de pertussis (Pa) (véase anteriormente),

(e) opcionalmente, antígeno de superficie de la hepatitis B (HepB o HB) (véase anteriormente),

(f) opcionalmente, un conjugado de una proteína vehículo y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib) (véase anteriormente),

15 (g) opcionalmente, uno o ambos conjugados de una proteína vehículo y un sacárido capsular de *N. meningitidis* tipo A (MenA) o *N. meningitidis* tipo C (MenC) (véase anteriormente), y

un segundo recipiente que comprende:

(2A)

20 (a) conjugados de una proteína vehículo y un sacárido capsular de *N. meningitidis* tipo A (MenA), *N. meningitidis* tipo C (MenC), *N. meningitidis* tipo W (MenW) y/o *N. meningitidis* tipo Y (MenY) (véase anteriormente para las diversas combinaciones de sacáridos Men de la invención), y

(b) opcionalmente, un conjugado de una proteína vehículo y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib); o

(2B)

(a) un conjugado de una proteína vehículo y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib), y

25 (b) opcionalmente, un conjugado de una proteína vehículo y el sacárido Vi de *Salmonella typhi*

El kit puede comprender opcionalmente un tercer recipiente que comprende:

(3)

(a) opcionalmente, el antígeno de superficie de la hepatitis B

(b) opcionalmente, un conjugado de una proteína vehículo y el sacárido Vi de *Salmonella typhi*

30 Los recipientes pueden comprender además, en cualquier caso, antígeno(s) de HepA y/o antígeno(s) de MenB y/o RTS, S y/o antígeno(s) de *Streptococcus pneumoniae*.

En cualquier caso, el mismo antígeno no debe estar presente en ambos recipientes.

En una forma de realización, el primer recipiente tiene, además de los componentes a), b), c), d) también e), f), g), e) + f), e) + g), f) + g) o e) + f) + g).

35 En una forma de realización, la vacuna del primer recipiente puede ser líquida y la vacuna del segundo recipiente puede ser líquida o estar liofilizada (por ejemplo, en presencia de un excipiente estabilizador conocido tal como la sacarosa o la trehalosa).

Los recipientes del kit se pueden empaquetar por separado u, opcionalmente, se pueden empaquetar juntos. En una forma de realización, el kit se proporciona con una lista de instrucciones para la administración de las vacunas en los dos o más recipientes.

40

En una forma de realización, en el caso en que un recipiente en un kit contiene un determinado conjugado de sacárido, el mismo conjugado no está presente en los otros recipientes del kit.

Los inventores creen que un kit proporcionado en la forma anterior puede presentar ventajosamente los diversos antígenos al sistema inmunitario del receptor de una manera óptima. El kit puede proporcionar a un médico un

5 procedimiento óptimo para la inmunización de un receptor con una o más de las siguientes ventajas: eficacia de la protección para todos los antígenos, mínima reactogenicidad, mínima interferencia de supresión por el vehículo, mínima interferencia entre adyuvante y antígeno, o mínima interferencia entre antígenos. De esta manera, pueden alcanzarse estos objetivos con el número mínimo (dos) de administraciones, realizadas de manera opcional en la misma visita al médico.

En una forma de realización, las vacunas del primer y del segundo recipiente se administran concomitantemente en sitios diferentes (como se describe a continuación en “administración de las vacunas de la invención”), y en una forma de realización alternativa, los inventores prevén que el contenido del primer y segundo recipiente se puedan mezclar (opcionalmente de manera extemporánea) antes de la administración como una sola vacuna.

10 Preparación de las vacunas de la invención

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir una formulación de vacuna que comprende la etapa de mezclar los componentes de la vacuna junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 En una forma de realización de la presente invención se proporciona una vacuna como se describe en el presente documento para su uso en un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por la infección por el poliovirus, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, y opcionalmente, el virus de la hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi* o el virus de la hepatitis A.

20 En otra forma de realización de la invención se proporciona un uso de las vacunas de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades causadas por la infección por el poliovirus, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, y opcionalmente, el virus de la hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi* o el virus de la hepatitis A.

25 También se da a conocer un procedimiento de inmunización de un receptor humano contra la enfermedad causada por el poliovirus, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, y opcionalmente, el virus de la hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi* o el virus de la hepatitis A, cuyo procedimiento comprende la administración al receptor de una dosis inmunoprotectora de la vacuna de la invención.

30 La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos de las vacunas típicas. Tal cantidad variará en función del inmunógeno específico que se utilice y de la manera en que se presente. En una forma de realización, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de sacárido, en otra forma de realización cada dosis comprenderá de 0,1 a 50 µg, en una forma de realización más cada dosis comprenderá de 0,1 a 10 µg, en otra forma de realización más cada dosis comprenderá de 1 a 5 µg de sacárido.

35 En una forma de realización, el contenido de antígenos proteicos en la vacuna estará en el intervalo de 1 a 100 µg, en otra forma de realización el contenido de antígenos proteicos en las vacunas estará en el intervalo de 5 a 50 µg, en una forma de realización más el contenido de antígenos proteicos en las vacunas estará en el intervalo de 5 a 25 µg.

40 La preparación de las vacunas está descrita en general en Vaccine Design [“The subunit and adjuvant approach” (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York]. El encapsulamiento en liposomas está descrito por Fullerton, Patente de EEUU 4.235.877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se da a conocer, por ejemplo, por Likhite, patente de EEUU 4.372.945 y por Armor y col., patente de EEUU 4.474.757. El uso de Quil A se da a conocer por Dalsgaard y col., 1977, Acta Vet Scand. 18: 349. El 3D-MPL se encuentra disponible de Ribi Immunochem, USA y se da a conocer en la Solicitud de Patente Británica N° 2220211 y en la patente de EEUU 4.912.094. El QS21 se da a conocer en la patente de EEUU 5.057.540.

45 En otra forma de realización de la invención se proporciona una vacuna multivalente que comprende el poliovirus inactivado (IPV) de la invención, células enteras muertas de *Bordetella pertussis* (Pw), toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), y opcionalmente, un conjugado de una proteína vehículo y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib - opcionalmente conjugado con TT, DT o CRM197), en la que la cantidad de conjugado por dosis de 0,5 ml de vacuna a granel es de 1 a 8 µg, y la inmunogenicidad del conjugado es equivalente o mejor que la de las composiciones que comprenden mayores cantidades de conjugado. Opcionalmente, se puede incluir el antígeno de superficie de la hepatitis B.

55 En una forma de realización, la cantidad de conjugado por dosis de 0,5 ml de vacuna a granel es inferior a 10 µg (de sacárido en el conjugado), en otra forma de realización la cantidad de conjugado es de 1 a 7, en otra forma de realización la cantidad de conjugado es de 2 a 6 µg, o en una forma de realización más es de aproximadamente 2,5, 3, 4 o 5 µg.

Se puede apreciar que ciertos componentes, por ejemplo los componentes de DTPw, se puede combinar por separado antes de añadir el AgHBs adsorbido u otros componentes.

5 También se proporciona un procedimiento de fabricación de las vacunas de la invención que comprende la etapa de mezclar IPV tipo 1, IPV tipo 2 y/o IPV tipo 3 con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un proceso típico para la preparación de la vacuna de la invención a granel con otros antígenos añadirá los componentes de IPV a una mezcla de los componentes D y T, es decir, los componentes DT se mezclan con los componentes de IPV. Este orden de mezcla permite ajustar la fuerza iónica y/o el pH de la composición (por ejemplo, $\text{pH} < 7$) antes de la adición de los componentes Pa o Pw. Por lo general, el HB preadsorbido en AlPO_4 se añade en primer lugar si se incluye en la composición, seguido por la adición de DT preadsorbida en $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 , seguido por la adición de TT preadsorbida en $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 , seguido por la adición del IPV opcionalmente preadsorbido en $\text{Al}(\text{OH})_3$, antes de ajustar el pH a, por ejemplo $\text{pH} 5,9 - 7,2$ o $\text{pH} 6 - 7$ o $\text{pH} 6,2 - 6,8$ o $\text{pH} 6,4 - 6,6$, y a continuación añadir Pw preadsorbido en AlPO_4 . Opcionalmente se pueden añadir los antígenos Hib, Vi, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB y/o HepA en cualquier punto de este proceso. En una forma de realización, los antígenos Hib, Vi, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB y/o HepA se añaden antes de ajustar el pH. En una forma de realización, se adsorbe uno o más antígenos de la invención sobre fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio o una mezcla de ambos. En otra forma de realización, los antígenos de la invención se mezclan con un excipiente y/o adyuvante(s) farmacéuticamente aceptables.

20 En una forma de realización, la composición de la vacuna de la invención puede prepararse en el siguiente orden: se añade el AgHBs preadsorbido, seguido por el toxoide diftérico preadsorbido, seguido por el toxoide tetánico preadsorbido y el IPV, a continuación se ajusta el pH hasta aproximadamente 6,5 antes de añadir el Pw preadsorbido.

25 En otra forma de realización, la composición de la vacuna de la invención pueden prepararse en el siguiente orden: se añade el toxoide tetánico preadsorbido, seguido por IPV, seguido por AgHBs preadsorbido, seguido por el toxoide diftérico preadsorbido, a continuación se ajusta el pH hasta aproximadamente 6,5 antes de añadir el Pw preadsorbido.

30 En general, las composiciones de vacuna combinada según cualquier aspecto de la invención se pueden preparar de la siguiente manera: el IPV, DTPw, HepB, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB, Vi, hepatitis A u otros componentes son preadsorbidos sobre un adyuvante adecuado, en especial hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o una mezcla de ambos. Después de dejar un tiempo para que tenga lugar la adsorción completa y estable de los componentes respectivos, los diferentes componentes se combinan en las condiciones adecuadas. El (los) conjugados de Hib, Vi, MenA, MenC, MenW y/o MenY pueden o no ser adsorbidos sobre sales de aluminio adyuvantes antes de mezclarlos con la vacuna DTPw.

En una forma de realización, las vacunas de la invención se preparan a una temperatura entre $15\text{ }^\circ\text{C}$ y $30\text{ }^\circ\text{C}$ (por ejemplo, entre $19\text{ }^\circ\text{C}$ y $27\text{ }^\circ\text{C}$, o a $23 \pm 4\text{ }^\circ\text{C}$).

35 **Administración de las vacunas de la invención**

Las vacunas pueden ser administradas de manera profiláctica (es decir, para prevenir la infección). La respuesta inmunitaria es de preferencia de protección y de preferencia incluye anticuerpos. La administración puede generar una respuesta de refuerzo.

40 Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo (posteriores) adecuadamente separadas en el tiempo. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de varias dosis. Pueden utilizarse varias dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis principal, que puede ser en el primer año de vida, puede ser seguido por un programa de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis iniciales (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre las dosis iniciales y de refuerzo puede determinarse de forma rutinaria.

45 En una forma de realización, el mamífero es un ser humano. En el caso en que la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es de preferencia un niño (por ejemplo, un niño joven o un bebé) o un adolescente; en el caso en que la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es de preferencia un adulto. Una vacuna destinada a los niños también se puede administrar a los adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, las dosis, la inmunogenicidad, etc.

50 Las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible a la infección, por medio de la administración de dicha vacuna directamente al paciente. La administración directa se puede realizar por medio de administración parenteral (intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa o en el espacio intersticial de un tejido); o por medio de administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar o a través de otras mucosas. En una forma de realización, la administración es por inyección intramuscular en el muslo o en el brazo. La inyección puede realizarse por medio de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también puede usarse como alternativa la inyección sin agujas. Una dosis típica para la administración por vía intramuscular es de 0,5 ml.

5 Las infecciones bacterianas afectan a diversas áreas del cuerpo y por lo tanto las composiciones de la invención se puede preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas. La composición se puede preparar para administración pulmonar, por ejemplo como un inhalador, utilizando un polvo fino o un pulverizador. La composición se puede preparar como un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración por vía nasal, ótica u ocular, por ejemplo, como pulverizador, gotas, gel o polvo (véase por ejemplo, Almeida & Alpar, 1996, J Drug Targeting, 3: 455; Bergquist y col., 1998, APMIS, 106: 800). Se ha comunicado la administración intranasal con éxito de las vacunas DTP (Ryan y col., 1999, Infect Immun, 67: 6270; Nagai y col., 2001, Vaccine, 19: 4824).

10 En una forma de realización, las vacunas del primer y segundo (y tercer, en caso que corresponda) recipiente se administran de forma concomitante en sitios diferentes, y en una forma de realización alternativa, los inventores prevén que se pueda mezclar el contenido del primer y del segundo recipiente (opcionalmente de manera extemporánea) antes de la administración como una sola vacuna.

La invención se puede utilizar para obtener inmunidad sistémica y/o de las mucosas.

15 Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica el control de la infección bacteriana después de la administración de la composición de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica el control de la respuesta inmunitaria contra los antígenos después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse por medio de la administración de las mismas a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12 a 16 meses de edad, o a modelos animales - documento WO 01/30390) y la posterior determinación de parámetros inmunológicos convencionales.

20 Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y en comparación con los valores determinados antes de la administración de la composición. En lugar de evaluar la eficacia de protección real en los pacientes, son muy conocidos los modelos animales estándar y los modelos in vitro, así como las correlaciones de protección útiles para evaluar la eficacia de las vacunas DTP.

25 En el presente documento, los inventores tienen la intención de que los términos "que comprende", "comprende" y "consiste" puedan opcionalmente sustituirse con las expresiones "que consiste en", "consiste en" "constituido por", respectivamente, en cada caso. Esto no cambia el significado normal de estos términos, y sólo pretende proporcionar una base para la sustitución, no para que su significado sea equivalente.

EJEMPLOS

30 Los ejemplos se proporcionan exclusivamente con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Pruebas en formulaciones de IPV de dosis bajas

Para todas las formulaciones del ejemplo 1, los antígenos son adsorbidos por la adición de sal de aluminio antes de la formulación, excepto el IPV que se añade sin adsorción.

Las siguientes tablas presentan el procedimiento de adsorción para D, T, Pw y AgHBs.

35

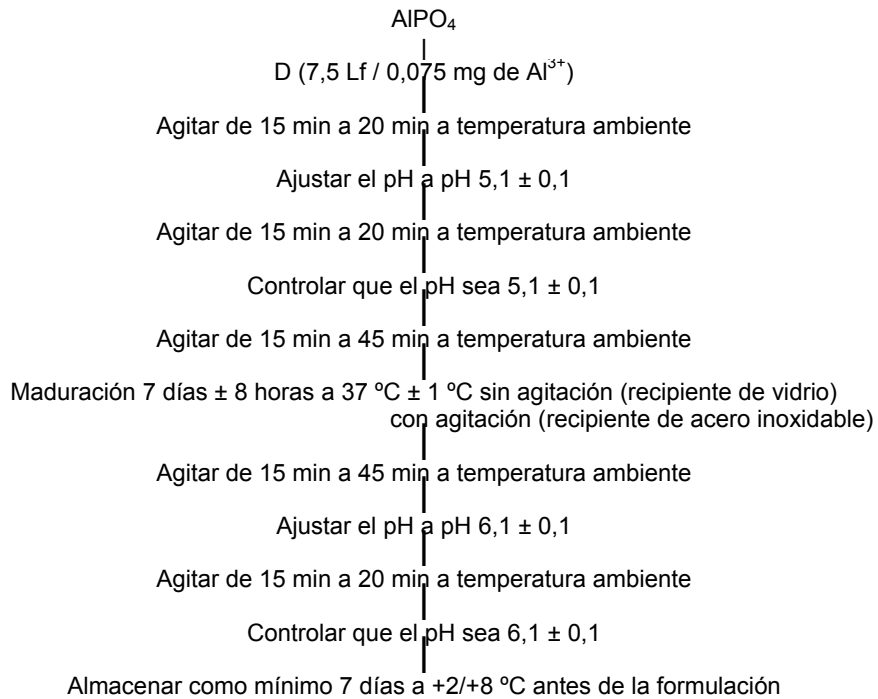


Tabla 1. Procedimiento de producción para la adsorción del toxoide diftérico

COMPOSICIÓN FINAL por dosis	
Difteria	7,5 Lf (± 420 Lf/ml)
Al ³⁺	0,075 mg
NaCl	150 mM
pH	6,1 ± 0,1
Volumen	aproximadamente 18 µl

Al(OH)_3
 tipo SUPERFOS
 T (3,25 Lf / 0,070 mg de Al^{3+})
 Agitar de 15 min a 20 min a temperatura ambiente
 Ajustar a pH $6,1 \pm 0,1$
 Agitar de 15 min a 20 min a temperatura ambiente
 Controlar que el pH sea $6,1 \pm 0,1$
 Agitar de 16 horas a 24 horas a temperatura ambiente
 NaCl 1500 mM (ad. 150 mM)
 Agitar de 15 min a 45 min a temperatura ambiente
 Ajustar el pH a pH $6,1 \pm 0,1$
 Agitar de 15 min a 20 min a temperatura ambiente
 Controlar que el pH sea $6,1 \pm 0,1$
 Almacenar como mínimo 14 días a $+2/+8$ °C antes de la formulación

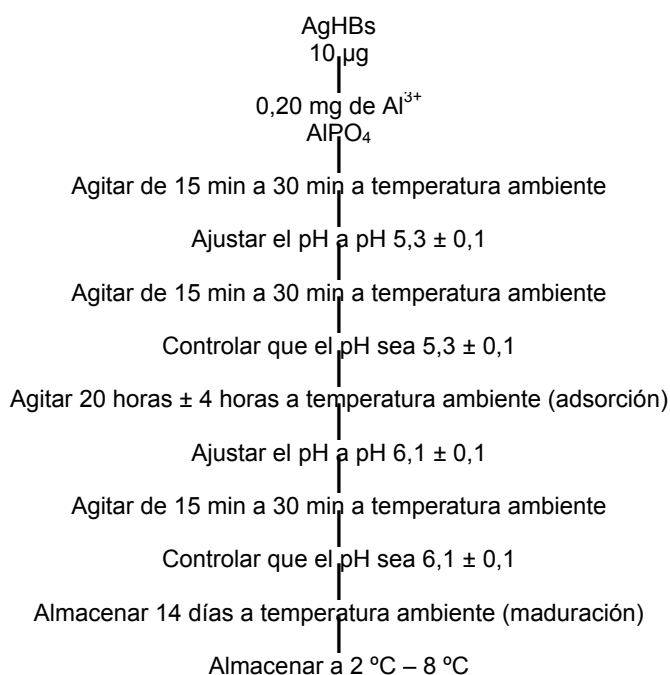
Tabla 2. Procedimiento de producción para la adsorción del toxoide tetánico

COMPOSICIÓN FINAL por dosis	
Tétanos	3,25 Lf (± 360 Lf/ml)
Al^{3+}	0,070 mg
NaCl	150 mM
pH	$6,1 \pm 0,1$
Volumen	aproximadamente 9 μl

AlPO_4
 0,17 mg de Al^{3+} / d
 (Brenntag)
 Ajustar el pH a pH $6,5 \pm 0,1$
 Agitar de 15 min a 20 min a temperatura ambiente
 Controlar que el pH sea $6,5 \pm 0,1$
 Pw
 20 UIO/d
 Agitar de 15 min a 45 min a temperatura ambiente
 Medir el pH
 Almacenar a $+2$ °C/ $+8$ °C

Tabla 3. Procedimiento de producción para adsorción de Pw

COMPOSICIÓN FINAL por dosis			
Antígenos		Adyuvante	[Al ³⁺] (mg)
Pw	20 UIO	AlPO ₄	0,170 mg
Al ³⁺	0,170 mg	AlPO ₄	
NaCl	150 mM		
pH	6,8		
Volumen	aproximadamente 65 µl		

**Tabla 4. Procedimiento de producción para la adsorción de AgHBs**

COMPOSICIÓN FINAL por dosis			
Antígenos		Adyuvante	[Al ³⁺] (mg)
AgHBs	10 µg	AlPO ₄	0,200 mg
Al ³⁺	0,200 mg	AlPO ₄	
NaCl	150 mM		
pH	6,1 ± 0,1		
Volumen	aproximadamente 50 µl		

5 Se probaron varias formulaciones diferentes:

- Una combinación de toxoide diftérico, toxoide tetánico, células enteras de pertussis y antígeno de superficie de la hepatitis B: DTP_{WSF}-HB como referencia (DTP_{WSF} significa que es una formulación libre de tiomerosal), formulada con el procedimiento de producción 1 (tabla 5).
- Producto Poliorix® de Glaxo SmithKline Biologicals S.A. (IPV solo no adsorbido) como referencia no adsorbida en la dosis estándar, formulada con el procedimiento de producción 2 (tabla 5).
- Una combinación de toxoide diftérico, toxoide tetánico, células enteras de pertussis, antígeno de superficie de la hepatitis B y virus de la polio inactivado: DTP_{WSF}-HB-IPV con adición del IPV antes de Pw, formulada con el procedimiento de producción 3 (tabla 5).

- Una combinación de toxoide diftérico, toxoide tetánico, células enteras de pertussis, antígeno de superficie de la hepatitis B: DTP_{WSF}-HB-IPV con adición del IPV inmediatamente después de la adsorción de T. Este procedimiento de adición permite la adsorción de IPV en Al(OH)₃. Esta vacuna está formulada con el procedimiento de producción 4 (tabla 5).

5 Un placebo que contiene sólo sales de aluminio, IPV y los tampones de los otros antígenos. Como el IPV es el único antígeno en este placebo, no hay competencia para la adsorción. Por lo tanto, el IPV se adsorbe completamente. Esta vacuna está formulada con el procedimiento de producción de 5 (tabla 5).

Las vacunas formuladas con el procedimiento de producción 2, 3, 4 y 5 se produjeron con un intervalo de dosis de IPV entre el 12,5% y 100% de la dosis estándar de IPV 40/8/32 UI/0,5 ml.

10

Etapa	Procedimiento de producción 1: DTP_{WSF}-HB
1	Agua para inyección hasta alcanzar el volumen final de la dosis de 0,5 ml
2	Añadir NaCl 1,5 M hasta alcanzar una concentración final de 150 mM
3	Añadir 115 µg de Al ³⁺ como AlPO ₄
4	Añadir 10 µg de AgHBs adsorbido
5	Añadir 7,5 Lf de toxoide diftérico adsorbido
6	Añadir 3,25 Lf de toxoide tetánico adsorbido
7	Agitar
8	Ajustar el pH a 6,5 ± 0,1
9	Agitar
10	Añadir 20 UIO de Pw adsorbido
11	Agitar
12	Almacenar a + 2 hasta + 8°C

15

20

Etapa	Procedimiento de producción 2: IPV solo		
1	Añadir IPV en un dosis de		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
	40 UI	8 UI	32 UI
	20 UI	4 UI	16 UI
	10 UI	2 UI	8 UI
	5 UI	1 UI	4 UI
2	Añadir tampón M199 hasta alcanzar el volumen final de 0,5 ml		
9	Agitar		
10	Ajustar el pH a 6,9 ± 0,2		
14	Almacenar a +2 hasta +8 °C		

Etapa	Procedimiento de producción 3: DTP_{WSF}-HB-IPV
1	Agua para inyección hasta alcanzar el volumen final de la dosis de 0,5 ml
2	Añadir NaCl 1,5 M hasta alcanzar una concentración final de 150 mM
3	Añadir 115 µg de Al ³⁺ como AlPO ₄
4	Añadir 10 µg de AgHBs adsorbido
5	Añadir 7,5 Lf de toxoide diftérico adsorbido
6	Añadir 3,25 Lf de toxoide tetánico adsorbido
7	Agitar
8	Añadir IPV en un dosis de

(continuación)

Etapa	Procedimiento de producción 3: DTPw _{SF} -HB-IPV		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
	40 UI	8 UI	32 UI
	20 UI	4 UI	16 UI
	10 UI	2 UI	8 UI
	5 UI	1 UI	4 UI

9 Agitar
 10 Ajustar el pH a $6,5 \pm 0,1$
 11 Agitar
 12 Añadir 20 UIO de Pw adsorbido
 13 Agitar
 14 Almacenar a +2 hasta +8 °C

Etapa	Procedimiento de producción 4: DTPw _{SF} -HB-IPV			
	1	Agua para inyección hasta alcanzar el volumen final de la dosis de 0,5 ml		
	2	Añadir NaCl 1,5 M hasta alcanzar una concentración final de 150 mM		
	3	Añadir 3,25 Lf de toxoide tetánico adsorbido		
	4	Añadir IPV en un dosis de		
		Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
	40 UI	8 UI	32 UI	
	20 UI	4 UI	16 UI	
	10 UI	2 UI	8 UI	
	5 UI	1 UI	4 UI	

5 Agitar
 6 Añadir 115 µg de Al³⁺ como AlPO₄
 7 Añadir 10 µg de AgHBs adsorbido
 8 Añadir 7,5 Lf de toxoide diftérico adsorbido
 9 Agitar
 10 Ajustar el pH a $6,5 \pm 0,1$
 11 Agitar
 12 Añadir 20 UIO Pw adsorbido
 13 Agitar
 14 Almacenar a +2 hasta +8 °C

Procedimiento de producción 5 : Placebo

Como para el procedimiento de producción 3, sin embargo se han omitido todos los antígenos aparte del IPV.

Tabla 5. Procedimiento de producción por dosis de 0,5 ml

5 Para el procedimiento de producción de la formulación 1: AgHBs, D y T se adsorbieron por separado en AlPO₄, AlPO₄ y Al(OH)₃, respectivamente. Los tres antígenos se añadieron de forma secuencial a una suspensión que contenía agua, NaCl y AlPO₄ libre. La mezcla se agitó durante 60-75 min. A continuación, se ajustó el pH a 6,5 antes de la adición del Pw adsorbido.

10 Para el procedimiento de producción de la formulación 3, los tres antígenos adsorbidos se añadieron de forma secuencial a una suspensión que contenía agua, NaCl y AlPO₄ libre. La mezcla se agitó durante 60-75 minutos antes de la adición de IPV. El pH se ajustó a 6,5 antes de la adición de los antígenos Pw.

5 Para el procedimiento de producción de la formulación 4, el antígeno T se adsorbió en $\text{Al}(\text{OH})_3$. El antígeno T preadsorbido se añadió a una suspensión que contenía agua y NaCl, seguido por IPV tipos 1, 2 y 3. La mezcla se agitó durante 60-75 minutos antes de la adición del AlPO_4 libre. Se añadió AgHBs preadsorbido, seguido por el antígeno D preadsorbido, y la mezcla se agitó durante otros 60-75 minutos. El pH se ajustó a 6,5 antes de la adición de los antígenos Pw.

El procedimiento de producción 3 se seleccionó eventualmente debido a la facilidad de fabricación ya que este protocolo sólo incluyó una etapa de agitación. Durante el proceso de fabricación de la vacuna, no se utiliza tiomersal y no se añade al producto final de la vacuna.

La siguiente tabla presenta la composición de las formulaciones para una dosis de 0,5 ml.

Tabla 6. Composición de formulaciones por dosis de 0,5 ml

Descripción	Al ³⁺ como Al(OH) ₃ para la adsorción de D	Al ³⁺ como Al(OH) ₃ para la adsorción de D	Al ³⁺ como AlPO ₄ para la adsorción de AgHBs	Al ³⁺ como AlPO ₄ para la adsorción de Pw	AlPO ₄ libre	Al (OH) ₃ libre	Dosis de toxoide diftérico	Dosis de toxoide tetánico	Dosis de pertussis	Dosis de AgHB	Dosis de IPV	
											% de la dosis estándar	Unidades de antígeno D(*) (T1/T2/T3)
Procedimiento de producción 1 DTP _{WSF} -HB	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	ND	7,5 Lf	3,25 Lf	20 UIO	10 µg	ND	ND
Procedimiento de producción 2 IPV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Procedimiento de producción 3 DTP _{WSF} -HB-IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	ND	7,5 Lf	3,25 Lf	20 UIO	10 µg	100%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Procedimiento de producción 4 DTP _{WSF} -HB-IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	ND	7,5 Lf	3,25 Lf	20 UIO	10 µg	100%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Procedimiento de producción 5 Placebo	ND	ND	ND	ND	560 µg	70 µg	ND	ND	ND	ND	100%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4

(*) El contenido del antígeno D es el valor buscado para la dilución de la carga de polio inactivado concentrado durante la formulación

Determinación de la potencia de polio en ratas por seroneutralización

La potencia de la vacuna se determinó mediante una prueba de seroneutralización después de la inoculación por vía intramuscular en ratas (Sprague-Dawley (OFA) o cualquier otra cepa validada anteriormente). Se inocularon grupos de 10 ratas sanas que no habían recibido estímulo previo por vía intramuscular (0,5 ml) con diluciones de las muestras de prueba, material de referencia en disolución salina tamponada con fosfato, o diluyente (disolución salina tamponada con fosfato). Las diez ratas a las que se inoculó el diluyente se utilizaron como controles negativos. De veinte a veintidós días después de la inoculación (período de inmunización), se anestesió profundamente a cada animal antes de extraerles la sangre por punción cardíaca. Las muestras de sangre se centrifugaron (aproximadamente a 800 g) y se analizaron los sueros.

5

10 Prueba de seroneutralización:

Los sueros se inactivaron por incubación a 56 °C durante 30 minutos. Se prepararon tres series de diluciones de los sueros, una para cada tipo de polio, en microplacas utilizando el medio de dilución adecuado. Para los tres tipos de virus de la polio, se añadió una cantidad de virus determinada previamente a las diluciones de los sueros. Las tres suspensiones de virus se diluyeron teniendo en cuenta sus valores respectivos. La dilución final se denomina "dilución de trabajo". Se añadió cada dilución de trabajo a las microplacas correspondientes. Se sellaron las placas y se incubaron a 37 °C ± 1 °C durante 16 horas. A continuación se añadieron las células Hep-2 y se incubaron las microplacas a 37 °C ± 1 °C durante 7 días. El efecto citopatogénico (ECP) del virus se determinó usando un microscopio invertido después de la tinción con azul de Coomassie.

15

La presencia de anticuerpos anti-poliomielitis inhibe el crecimiento del virus y la aparición del correspondiente ECP. Los valores de anticuerpos anti-virus de poliomiélitis (tipos 1, 2 y 3) corresponden a la inversa de la última dilución sin ningún tipo de ECP.

20

En cada grupo, se registraron los animales con anticuerpos neutralizantes y se determinaron los valores de anticuerpos de cada muestra de suero para los diferentes tipos de poliovirus. El valor de los anticuerpos neutralizantes se expresa como el \log_2 de la inversa de la mayor dilución de la muestra de suero que inhibe totalmente el efecto citopático del poliovirus en células Hep-2. A continuación se determinó la media geométrica del valor por dilución (MGV) y por tipo de virus para cada grupo de ratas.

25

Para cada tipo de virus, también se calculó la dilución de la vacuna y, posteriormente, la cantidad de antígeno D que indujo la aparición de anticuerpos neutralizantes en el 50% de las ratas (DE50) mediante el análisis probit. El DE50 se expresó en unidades de antígeno D.

30

Para cuantificar la potencia relativa a la de la vacuna de referencia (normalmente Poliorix®, pero puede ser una vacuna DTPaHBIPV como Pediarix®), se midió la potencia relativa (PR) definida como la relación de dos respuestas de dosis equivalentes en una prueba de dosis múltiples. En este enfoque, la potencia de la vacuna de prueba se calculó mediante el ensayo de líneas paralelas como se describe en Finney, 1978 (Statistical Method in Biological Assay, Charles Griffin & Company Ltd, Londres, 1978).

35 Determinación de la potencia de polio tipo 1, 2 y 3 por ELISA

La determinación de la potencia de polio mediante ELISA se llevó a cabo en una o dos etapas, dependiendo de si la medición se llevaba a cabo en IPV no adsorbido a granel frente a las vacunas formuladas, respectivamente:

1. Desorción de la vacuna adsorbida final (para la medición de unidades de antígeno D en vacunas formuladas - no se requiere para la medición en antígeno IPV no adsorbido a granel);

40 2. Prueba de ELISA para la cuantificación del contenido de antígeno D de vacuna con desorción y no adsorbida y/o polio a granel.

Etapas de desorción

Tras centrifugar durante 10 minutos la vacuna de prueba adsorbida, se llevaron a cabo tres desorciones sucesivas, mediante la adición de un tampón fosfato de desorción al sedimento, mezclando e incubando a temperatura ambiente. El primer y segundo períodos de desorción fueron de 2 horas, siendo el período de incubación de la tercera extracción de una noche a temperatura ambiente. Se mezcló el material recogido de las tres extracciones y se diluyó con disolución de tampón fosfato (PBS) sin Ca y Mg que contenía albúmina de suero bovino (ASB) y Tween 20.

45

Los tres antígenos de poliovirus se cuantificaron mediante ELISA como se describe a continuación.

50 Cuantificación del antígeno D mediante ELISA:

Se recubrieron placas de microvaloración con IgG específica anti-virus de la polio (tipos 1, 2 o 3) de conejo, diluida con tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después del lavado, se añadió la disolución de saturación (disolución salina tamponada con fosfato sin Ca y Mg + ASB al 1%). Se añadieron por

duplicado blancos (PBS) y diluciones en serie de muestras de vacunas y patrones internos no adsorbidos. La preparación del patrón interno trivalente contiene antígenos tipo 1, 2 y 3 calibrados. El calibrador es la referencia biológica de la farmacopea europea (EPBRP, por su sigla en inglés).

5 Para todas las etapas siguientes, las placas de microvaloración se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37 °C y se lavaron. Se añadió IgG anti-virus de la polio (tipo 1, 2 o 3) de conejo conjugada con peroxidasa, diluida con tampón fosfato (sin Ca y Mg + Tween 20) que contenía ASB. Se añadió la disolución de sustrato, que contenía la tetrametilbencidina disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y diluida en tampón acetato que contenía H₂O₂ al 0,003%, seguido por una incubación durante 15-30 minutos en la oscuridad. A continuación, se añadió la disolución de parada, que contenía H₂SO₄. En el plazo de una hora, se leyó la densidad óptica (DO) de cada pocillo usando un
10 fotómetro calibrado en 450 nm con una referencia en 620 nm.

La concentración de antígeno D en las muestras de prueba se calculó a partir de la curva estándar obtenida por el trazado de los valores de DO frente a las concentraciones de antígeno del patrón.

Como complemento de la potencia mediante ELISA, cualquier antígeno IPV no adsorbido puede ser detectado por el procedimiento de completitud:

15 **Completitud de adsorción para polio tipos 1, 2 y 3 no unido al adyuvante mediante Elisa**

Se llevaron a cabo dos centrifugaciones sucesivas. A continuación, se recogió el sobrenadante y se probó sin diluir por duplicado en microplacas por ELISA. Las microplacas se recubrieron con IgG específica anti-virus de la polio (tipo 1, 2 o 3) de conejo, diluida con tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6), y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después del lavado, se añadió la disolución de saturación (disolución salina tamponada con fosfato, sin Ca y Mg + ASB al 1%). Se añadieron por duplicado blancos (PBS), el sobrenadante y el patrón interno no adsorbido.
20

Para todas las etapas siguientes, las placas de microvaloración se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37 °C y se lavaron. Se añadió IgG anti-virus de la polio (tipo 1, 2 o 3) de conejo conjugada con peroxidasa, diluida con tampón fosfato (sin Ca y Mg + Tween 20) que contenía ASB. Se añadió la disolución de sustrato, que contenía la tetrametilbencidina disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y diluida en tampón acetato que contenía H₂O₂ al 0,003%, seguido por una incubación durante 15-30 minutos en la oscuridad. A continuación, se añadió la disolución de parada, que contenía H₂SO₄. En el plazo de una hora, se leyó la densidad óptica (D.O.) de cada pocillo usando un
25 fotómetro calibrado en 450 nm con una referencia en 620 nm.

La completitud se considera positiva (antígeno en el sobrenadante) si la DO media de la muestra es mayor que los valores medios de DO de los blancos + 3 desviaciones estándar y si la DO media de la muestra es mayor a 0,1.

30 En caso de completitud positiva, el contenido de antígeno se mide por el procedimiento de ELISA como se describe en la segunda etapa de la potencia de polio tipo 1, 2 y 3 mediante ELISA.

Procedimiento de medición de la Unidad Internacional de Opacidad (UIO)

La concentración de células (UIO) se puede determinar usando la disolución patrón de IRPO (preparación de referencia internacional de opacidad) por medio visual o mediante la medición de la absorbancia a 660 nm.

35 La opacidad de la suspensión de cepa única se determina aplicando la ecuación de "opacidad asignada" de la siguiente manera:

$$AO = LO / KO \times CO,$$

donde AO = opacidad asignada, LO = opacidad de la muestra viva recogida, KO = opacidad de la muestra muerta recogida y CO = opacidad del concentrado.

40 **RESULTADOS**

Determinación de la potencia de polio en ratas por seroneutralización con la dosis estándar de 40:8:32

Se llevaron a cabo experimentos para determinar la potencia de IPV tipos 1, 2 y 3. Los resultados se muestran en la Tabla 8 a continuación (en el presente documento, 40:8:32 unidades de antígeno D de IPV tipos 1, 2 y 3, respectivamente, es equivalente a la dosis de IPV al 100%).

45 **Tabla 8. Potencia de IPV tipos 1, 2 y 3 en tres formulaciones de vacunas diferentes**

Descripción	Potencia de IPV (DE50 expresada en UI/dosis)		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Ref. Poliorix	20,78	8,88	40,02

(continuación)

Descripción	Potencia de IPV (DE50 expresada en UI/dosis)		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Ref. DTPaHBIPV	3,21	0,57	8,62
Procedimiento de producción 3: DTPw_{SF}-HB-IPV	<1,93	0,64	<2,57

La formulación DTPw_{SF}-HB-IPV (IPV al 100%) presenta potencias de IPV mejores que Poliorix de referencia y similares o mejores que la referencia DTPaHBIPV.

5 Evaluación de la potencia de IPV con dosis reducidas de IPV

La potencia se midió por medio de los procedimientos in vitro e in vivo descritos anteriormente.

Se estudió la potencia mediante Elisa de IPV en dosis reducidas para ambas formulaciones de los procedimientos de producción 3 y 4 in vitro y se comparó con la de la referencia DTPaIPVHB como se muestra en la Tabla 9. Se probaron dos lotes para cada formulación para el procedimiento de producción 3.

- 10 Se calculó el porcentaje de recuperación con respecto al contenido de antígeno tomado de IPV a granel para cada formulación (por ejemplo, 40/8/32 para la formulación que contenía IPV al 100%; 20/8/16 para la formulación que contenía IPV al 50%; 10/4/8 para la formulación que contenía IPV al 25%, 5/2/4 para la formulación que contenía IPV al 12,5)

Tabla 9

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de polio (% de recuperación)	Complejitud (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Complejitud (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Complejitud (% de recuperación)
Referencia DTPaIPVHB	82%	NP	99%	NP	93%	NP
DTPw _{SF} -HB-IPV 1 "Procedimiento de producción 3" IPV al 100%	46%	47%	94%	<5%	24%	74%
DTPw _{SF} -HB-IPV 2 "Procedimiento de producción 3" IPV al 100%	80%	<5%	100%	<5,0%	81%	17%
DTPw _{SF} -HB-IPV 1 "Procedimiento de producción 3" IPV al 50%	48%	31%	98%	<5%	29%	64%

(continuación)

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de polio (% de recuperación)	Compleitud (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Compleitud (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Compleitud (% de recuperación)
DTPwSF-HB-IPV 2 "Procedimiento de producción 3" IPV al 50%	71%	<5%	99%	<5%	91%	>5%
DTPwSF-HB-IPV 1 "Procedimiento de producción 3" IPV al 25%	54%	34%	115%	<5%	33%	71%
DTPwSF-HB-IPV 2 "Procedimiento de producción 3" IPV al 25%	81%	<5%	115%	<5%	107%	<5%
DTPwSF-HB-IPV "Procedimiento de producción 3" IPV al 12,5%	50%	24%	110%	<5%	28%	60%
DTPwSF-HB-IPV "Procedimiento de producción 4" IPV al 100%	41%	48%	93%	<5%	23%	51%
DTPwSF-HB-IPV "Procedimiento de producción 4" IPV al 50%	47%	37%	98%	<5%	28%	69%
DTPwSF-HB-IPV "Procedimiento de producción 4" IPV al 25%	51%	28%	80%	<5%	33%	61%

(continuación)

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de polio (% de recuperación)	Compleitud (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Compleitud (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Compleitud (% de recuperación)
DTPwSF-HB-IPV "Procedimiento de producción 4" IPV al 12,5%	42%	22%	100%	<5%	40%	58%
Placebo "Procedimiento de producción 5" IPV al 100%	86%	<5%	98%	<5%	107%	<5%
Placebo "Procedimiento de producción 5" IPV al 50%	94%	<5%	110%	<5%	111%	<5%
Placebo "Procedimiento de producción 5" IPV al 25%	80%	<5%	100%	<5%	104%	<5%
Placebo "Procedimiento de producción 5" IPV al 12,5%	72%	<5%	100%	<5%	98%	<5%

5 La Tabla 9 muestra que la completitud de la adsorción es similar para todas las dosis de IPV. El Tipo 1 y el Tipo 3 son muy fuertemente desorbidos (17% - 74%) mientras que el Tipo 2 permanece bien adsorbido. Los tres tipos están bien adsorbidos para la formulación de placebo para todas las dosis de IPV. La adsorción es similar a la de la vacuna de referencia DTPaIPVHB.

10 Existe una variabilidad de la completitud de IPV por el hecho de que el procedimiento de cuantificación de la completitud no está validado para las formulaciones DTPwHB IPV ni para concentraciones de IPV más bajas (<40/8/32 Unidades de antígeno D/0,5 ml).

15 Se estudió la potencia relativa in vivo (expresada en comparación con la vacuna de referencia poliorix) de dosis de IPV reducida para ambas formulaciones de los procedimientos de producción 3 y 4, en comparación con las formulaciones de referencia, como se muestra en las Figuras 1 y 2. Se probaron dos lotes para cada formulación para el procedimiento de producción 3.

20 La Figura 1 muestra que la potencia de IPV de DTPwSF-HB-IPV con IPV al 100% es ligeramente superior a la potencia de IPV en DTPaHBIPV. Puede verse que la potencia de IPV para DTPwSF-HB-IPV al 50% de la formulación del procedimiento de producción 3 es similar la de DTPaHBIPV al 100%. La potencia de IPV para DTPwSF-HB-IPV al 25% del procedimiento de producción 3 es ligeramente inferior a la de Poliorix®. También se encontró que el 12,5% de la dosis de IPV no fue suficiente para obtener una buena potencia de IPV.

La Figura 2 muestra que la potencia de IPV es similar para la formulación del procedimiento de producción 3 y para la formulación del procedimiento de producción 4. También se muestra que existe una tendencia hacia una mejor potencia para el placebo que para DTPwSF-HB-IPV.

Estos datos confirman, por tanto que una dosis reducida de IPV es suficiente para obtener una buena potencia en vivo.

Ejemplo 2: Viabilidad de la no utilización de tiomersal en las vacunas de la invención

5 La prueba de eficacia al conservante (PEC) permite la demostración de la actividad antimicrobiana de la vacuna en prueba. La prueba consiste en:

- desafiar la preparación de la vacuna, en su etapa de recipiente final, con un inóculo prescrito de microorganismos adecuados,
- almacenar la preparación inoculada a una temperatura prescrita
- retirar muestras del recipiente a intervalos especificados de tiempo y hacer el recuento de organismos en las muestras recogidas.

10 El procedimiento de las pruebas PEC se describe en la Farmacopea Europea (5.1.3) y en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por su sigla en inglés) (<51>). De acuerdo con estas directrices, la actividad antimicrobiana se evalúa mediante la comparación de la reducción del número de microorganismos viables con los criterios mencionados en la siguiente tabla (Tabla 7)

15

Tabla 7. Criterios de la FE y de la USP

Microorganismos	Tiempo	Criterios: reducción log			
		FE A	FE B	FE C	USP
<u>Bacterias</u>					
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 h	2			
<i>Escherichia coli</i>	d 1	3	1	Na*	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	d 7		3	Na*	1
	d 14			3	3
	d 28	Nr*	Na*	Na*	Na*
<u>Levaduras y mohos</u>					
<i>Candida albicans</i>	d7	2			Na*
<i>Aspergillus niger</i>	d14		1	Na*	Na*
	d28	Na*	Na*	Na*	Na*
Nr* : no recuperado					
Na* : no aumentado					

Ejemplo 3: Efecto del componente Hib sobre la potencia de IPV y la estabilidad de IPV a lo largo del tiempo

20 Se midió la potencia relativa de IPV como se describe en el Ejemplo 1 para determinar los efectos que pueda tener el componente Hib sobre la potencia de IPV y para evaluar la estabilidad de IPV a lo largo del tiempo en diferentes dosis de IPV. Las vacunas investigadas fueron DTPwHBIPV (40-8-32), DTPwHBIPV con Hib reconstituido y almacenado durante 8 meses, DTPwHBIPV (20-4-16), DTPwHBIPV (20-4-16) con Hib reconstituido y almacenado durante 8 meses, DTPwHBIPV (20-4-16) y almacenado durante 8 meses, DTPwHBIPV (10-2-8) y DTPwHBIPV (10-2-8) con Hib reconstituido y almacenado durante 8 meses. Los valores de PR se midieron con relación a DTPaIPVHB (Pediarix) (Figura 3a) o Poliorix (Figura 3b). Se encontró que el componente Hib no tuvo ningún efecto sobre la potencia de IPV. Se encontró que la potencia relativa de IPV se mantenía a los 8 meses (Figura 3).

25

Ejemplo 4: Efecto de la relación $AlPO_4/Al(OH)_3$ en el aspecto visual, la adsorción de D y T y la potencia de IPV

Las formulaciones se llevaron a cabo cambiando la composición de aluminio.

30 Las formulaciones DTP_{WSF}-HB-IPV por lo general contienen 630 µg de aluminio: 560 µg de Al^{3+} como $AlPO_4$, 70 µg de Al^{3+} como $Al(OH)_3$. Las sales de aluminio se utilizan para adsorber D, T, Pw y AgHBs. Durante la formulación se añadieron 115 µg de Al^{3+} de $AlPO_4$ libre.

Las formulaciones se llevaron a cabo con las siguientes relaciones de Al^{3+} libre:

Tabla 10. Relación $AlPO_4/Al(OH)_3$

	Al^{3+} de $Al(OH)_3$ µg	Al^{3+} de $AlPO_4$ µg
Lote 1	0	115
Lote 2	23	92
Lote 3	69	46

(continuación)

	Al ³⁺ de Al(OH) ₃ µg	Al ³⁺ de AlPO ₄ µg
Lote 4	46	69
Lote 5	92	23
Lote 6	115	0

Tabla 11. Procedimiento de producción para DTPw_{SF}-HB-IPV

Etapas	Procedimiento de producción 3: DTPw_{SF}-HB-IPV
1	Agua para inyección hasta alcanzar un volumen final de dosis de 0,5 ml
2	Añadir NaCl 1,5 M hasta alcanzar una concentración final de 150 mM
3	Añadir 115 µg de Al ³⁺ con diferentes relaciones de AlPO ₄ /Al(OH) ₃
4	Añadir 10 µg de AgHBs adsorbido
5	Añadir 7,5 Lf de toxoide diftérico adsorbido
6	Añadir 3,25 Lf de toxoide tetánico adsorbido
7	Agitar
8	Añadir IPV en una dosis de 40/8/32 UI
9	Agitar
10	Ajustar el pH a 6,5 ± 0,1
11	Agitar
12	Añadir 20 UIO de Pw adsorbido
13	Agitar
14	Almacenar a +2 hasta +8 °C

5

Se observó el aspecto visual y, hasta una relación de 69/46, se obtiene una agregación aceptable.

Las formulaciones se llevaron a cabo con el mismo procedimiento de producción y un intervalo de dosis de IPV de entre 0 y 100% de la dosis regular de IPV.

10 El porcentaje de adsorción de los toxoides D y T se midió mediante ELISA. Se realizó un seguimiento de la estabilidad de la adsorción por medio de un tratamiento de 7 días a 37 °C. Los resultados se presentan en las Tablas 12 y 14.

Tabla 12. Porcentaje de desorción de toxoide D en DTPw_{SF}-HB-IPV con intervalo de dosis de IPV

	Dosis de IPV	RELACIÓN Al(OH) ₃ /AlPO ₄					
		0/115		23/92		46/69	
		T0	7 d 37 °C	T0	7 d 37 °C	T0	7 d 37 °C
Pw_{SF}	0%	<1%	25%	<1%	6%	/	
	25%	<1%	29%	<1	1%	<1%	5%
	50%	3%	41%	<1	26%	<1%	17%
	100%	4%	49%	<1	23%	<1%	11%

Tabla 13. Porcentaje de desorción de toxoide T en DTPw_{SF}-HB-IPV con intervalo de dosis de IPV

	Dosis IPV	RELACIÓN Al(OH) ₃ /AlPO ₄					
		0/115		23/92		46/69	
		T0	7 d 37 °C	T0	7 d 37 °C	T0	7 d 37 °C
Pw_{SF}	0%	<1%	34%	<1%	12%	/	
	25%	<1%	50%	<1	32%	<1%	12%

15

(continuación)

		RELACIÓN $Al(OH)_3/AlPO_4$					
		0/115		23/92		46/69	
		T0	7 d 37 °C	T0	7 d 37 °C	T0	7 d 37 °C
Pw_{SF}	50%	5%	61%	<1	51%	<1%	33%
	100%	8%	63%	<1	41%	<1%	29%

Se realizó el seguimiento de la adsorción de IPV. La estabilidad de la adsorción se siguió por medio de un tratamiento de 21 días a 25 °C.

5 **Tabla 14. Porcentaje de desorción de IPV en DTPwHB-IPV con intervalo de dosis de IPV**

IPV		Estimación de Ag no adsorbido					
		RELACIÓN $Al(OH)_3/AlPO_4$					
		0/115		23/92		46/69	
Dosis	Tipo	T0	21 d 25 °C	T0	21 d 25 °C	T0	21 d 25 °C
0%	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	AGREGACIÓN	
25%	Tipo 1	~10-20%	~20-30%	~10-20%	~20-30%	< 10%	~20-30%
	Tipo 2	< 10%	< 10%	< 10%	< 10%	< 10%	< 10%
	Tipo 3	> 30%	> 30%	~20-30%	> 30%	< 10%	> 30%
50%	Tipo 1	> 30%	> 30%	~10-20%	> 30%	~10-20%	> 30%
	Tipo 2	~10-20%	~10-20%	< 10%	< 10%	< 10%	< 10%
	Tipo 3	> 30%	> 30%	~10-20%	> 30%	~10-20%	> 30%
100%	Tipo 1	> 30%	> 30%	~10-20%	> 30%	~10-20%	> 30%
	Tipo 2	~10-20%	~10-20%	< 10%	< 10%	< 10%	< 10%
	Tipo 3	> 30%	> 30%	~20-30%	> 30%	~20-30%	> 30%

El aumento del contenido de $Al(OH)_3$ en las formulaciones permitió una mejora en la adsorción para D, T e IPV.

La mejor relación de adsorción se obtuvo con la relación $Al(OH)_3/AlPO_4$ de 46/69.

A esta relación:

- 10
- La adsorción de T y D es completa en T0. La desorción, tras un estudio de estabilidad acelerado de 7 días a 37 °C, presentó <20% de desorción para D, <30% para T.
 - Se adsorben todos los tipo de IPV. La desorción del Tipo 3 tuvo lugar a los 21 días a 25 °C.

Se probaron las formulaciones con la relación 46/69 in vivo y se compararon con Tetravac, Poliorix y una vacuna DTPaIPV.

15 **Tabla 15. Resultados de potencias in vivo**

Muestra	DE50		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
DTPw-HB-IPV al 100%/HIB Relación 46/69	< 1,93	< 0,64	2,57
DTPw-HB-IPV al 50%/HIB Relación 46/69	< 1,59	0,46	< 1,67
DTPw-HB-IPV al 25%/HIB Relación 46/69	3,08	0,96	3,25
Tetravac	8,53	0,39	9,15

(continuación)

Muestra	DE50		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Poliorix	9,52	2,64	15,06
DTPaHBIPV	< 5,18	< 0,64	15,01

5 No hay diferencias significativas (DE50) entre las formulaciones DTPw-HB-IPV. DTPaHBIPV, Tetravac y Poliorix dan resultados similares, inferiores a las formulaciones DTPw-HB-IPV (a excepción del tipo 2, para el que todas las formulaciones son equivalentes).

Ejemplo 5: Evaluación clínica de la vacuna DTPw-HBV-IPV/Hib de investigación con dosis de IPV reducidas

Está previsto realizar un estudio de factibilidad, de fase II, para evaluar la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad de tres formulaciones diferentes de la vacuna DTPw-HBV-IPV/Hib de investigación de GSK Biologicals en comparación con las vacunas comerciales DTPw-HBV/Hib e IPV que se administran conjuntamente.

10 • Indicación/poblaciones:

Inmunización primaria de niños sanos en la primera semana de vida contra la difteria, el tétanos, la tos ferina, la hepatitis B, la poliomielitis y enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b.

Grupos de estudio:

Vacuna DTPw-HBV-IPV (dosis estándar) / Hib

15 Vacuna DTPw-HBV-IPV (49% de la dosis estándar) / Hib

Vacuna DTPw-HBV-IPV (26% de la dosis estándar) / Hib

Vacunas DTPw-HBV/Hib + IPV

• Objetivos primarios compuestos:

20 Se evaluarán los objetivos primarios compuestos de manera secuencial: es decir, los objetivos segundo y tercero sólo se evaluarán se ha cumplido si el anterior.

✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna DTPw-HBV-IPV (dosis estándar) / Hib a la vacuna IPV que se administra conjuntamente con la vacuna DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta de anticuerpos para los tres tipos de poliovirus, un mes después del curso de vacunación principal.

25 *Se alcanzará el objetivo de no inferioridad si el límite superior del IC del 95% asintótico estandarizado sobre la diferencia entre los grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (dosis estándar) / Hib) en términos de tasas de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es $\leq 10\%$.*

✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna DTPw-VHB-IPV (49% de la dosis estándar) / Hib a la vacuna IPV que se administra conjuntamente con la vacuna DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta de anticuerpos para los tres tipos de poliovirus, un mes después del curso de vacunación principal.

30 *Se alcanzará el objetivo de no inferioridad si el límite superior del IC del 95% asintótico estandarizado sobre la diferencia entre los grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (49% de la dosis estándar) / Hib) en términos de tasas de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es $\leq 10\%$.*

35 ✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna DTPw-VHB-IPV (26% de la dosis estándar) / Hib a la vacuna IPV que se administra conjuntamente con la vacuna DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta de anticuerpos para los tres tipos de poliovirus, un mes después del curso de vacunación principal.

Se alcanzará el objetivo de no inferioridad si el límite superior del IC del 95% asintótico estandarizado sobre la diferencia entre los grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (26% de la dosis estándar) / Hib) en términos de tasas de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es $\leq 10\%$.

• Objetivos secundarios:

40 Inmunogenicidad

Evaluar la inmunogenicidad de la vacuna candidata DTPw-HBV-IPV/Hib en términos de respuesta para todos los antígenos de la vacuna en comparación con las vacunas DTPw-HBV/Hib e IPV administradas conjuntamente.

Reactogenicidad

Evaluar la reactogenicidad y la seguridad de las vacunas en estudio, en términos de síntomas inducidos, síntomas no inducidos y acontecimientos adversos graves.

- **Programa de vacunación**

5 Programa de vacunación primaria de tres dosis a las 6, 10 y 14 semanas de edad. Todos los sujetos reciben una dosis de Hepatitis B al nacer.

- **País:**

Filipinas.

- **Extracción de muestras de sangre:**

10 Antes y después de la vacunación 3.

- **Formulaciones de vacunas:**

Tabla 16. Formulaciones de vacunas

Vacuna	Formulación/dosis	Presentación	Volumen
DTPw-HBV-IPV/Hib de GSK Biologicals	Toxoide diftérico: no menos de 30 UI (7,5 Lf) Toxoide tetánico: no menos de 60 UI (3,25 Lf) <i>Bordetella pertussis</i> , muerta: no menos de 4 UI (20 UO) ADN-r AgHBs: 10 µg Aluminio como sales: 0,66 mg	Líquido blancuzco en viales monodosis	0,5 ml de la vacuna reconstituida
	Componente IPV (dosis estándar) Componente IPV (49% de la dosis estándar) Componente IPV (26% de la dosis estándar)		
	Conjugado de polisacárido capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b: 2,5 µg y toxoide tetánico: 5-10 µg Lactosa: 12,6 mg Aluminio como sales: 30 µg	Pellas liofilizadas en viales monodosis	

(continuación)

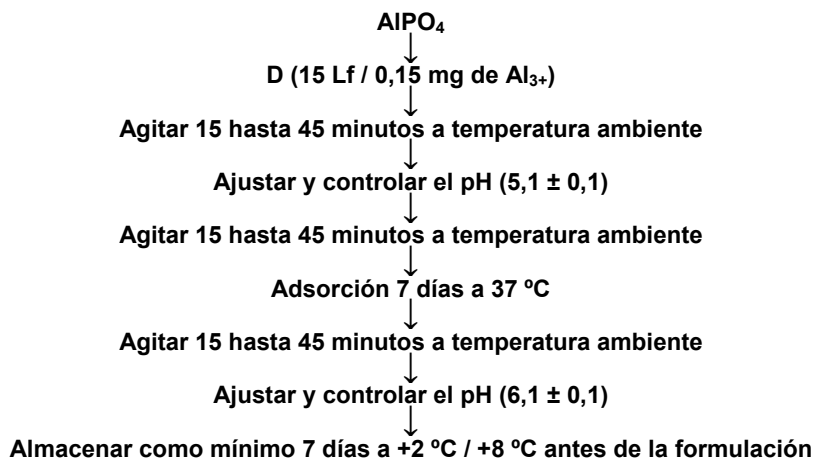
Vacuna	Formulación/dosis	Presentación	Volumen
DTPw-HBV/Hib (Zilbrix™ Hib) de GSK Biologicals	Toxoide diftérico: no menos de 30 UI (7,5 Lf) Toxoide tetánico: no menos de 60 UI (3,25 Lf) <i>Bordetella pertussis</i> , muerta: no menos de 4 UI (20 UO) ADN-r AgHBs: 10 µg Aluminio como sales: 0,66 mg Tiomersal: 8 µg	Líquido blancuzco en viales monodosis	1 ml de la vacuna reconstituida
	Conjugado de polisacárido capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b: 2,5 µg y toxoide tetánico: 5-10 µg Lactosa: 12,6 mg Aluminio como sales: 30 µg	Pellas liofilizadas en viales monodosis	
IPV (Poliorix™) de GSK Biologicals	Poliovirus tipo 1 inactivado: 40 unidades de antígeno D Poliovirus tipo 2 inactivado: 8 unidades de antígeno D Poliovirus tipo 3 inactivado: 32 unidades de antígeno D 2-fenoxietanol: 2,5 mg máximo Polisorbato: 50 µg máximo Formaldehído: 100 µg máximo Disolución salina tamponada con fosfato Contiene aminoácidos para inyección, cantidad necesaria, ad. 0,5 ml	Líquido blancuzco en viales monodosis	0,5 ml

PREADSORCIÓN DE LOS ANTÍGENOS

- 5 La formulación DTPw-HBV-IPV combina el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, tres cepas de *Bordetella pertussis*, el antígeno de superficie principal (AgHBs) purificado del virus de la Hepatitis B (VHB) y el virus de la polio inactivado (IPV). Estos antígenos, excepto IPV, se preadsorbieron en primer lugar sobre sales de aluminio antes de mezclarlos con sal de aluminio, tampón cloruro de sodio y agua para inyección.

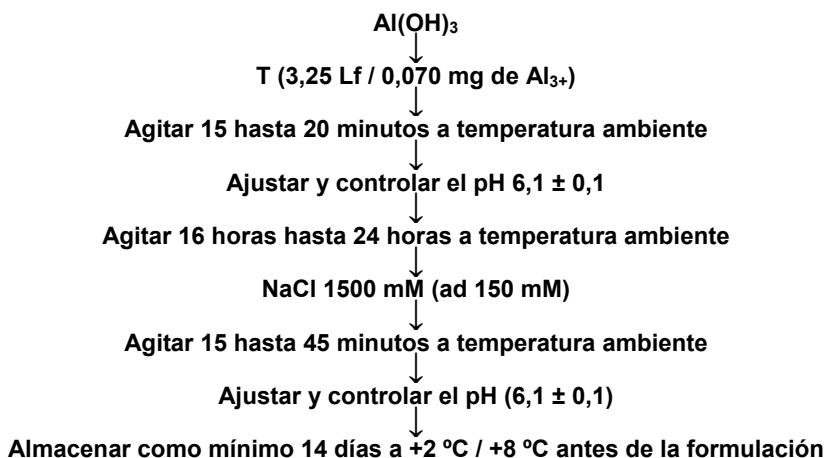
Adsorción del toxoide diftérico

- 10 El concentrado purificado de difteria fue adsorbido sobre fosfato de aluminio en una proporción de 15 Lf de toxoide diftérico / 0,15 mg de Al³⁺. Los dos componentes se agitaron durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente. El pH se ajustó a un pH de 5,1 ± 0,1, seguido por la agitación durante 15 hasta 45 minutos. La mezcla se almacenó durante una semana a 37 °C. Después de agitar de 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente, el pH se ajustó a un pH de 6,1 ± 0,1. El concentrado adsorbido se almacenó entre +2 °C y +8 °C durante al menos 7 días antes de la formulación final de la vacuna DTPw-HB-IPV. La Figura 1 a continuación pone de relieve el proceso de adsorción de la fabricación del toxoide diftérico preadsorbido a granel.
- 15

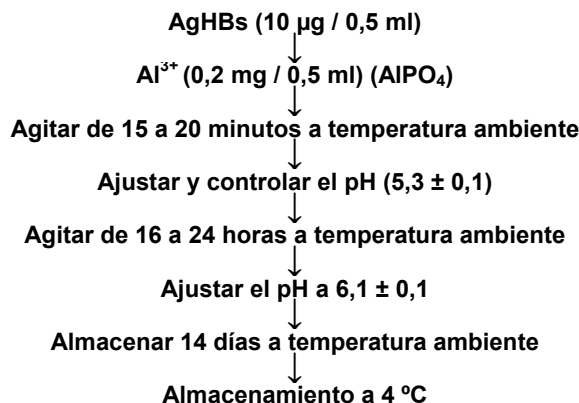
Diagrama de flujo de la adsorción del toxoide diftérico**Adsorción de toxoide tetánico**

5 El concentrado purificado de toxoide tetánico se adsorbió sobre hidróxido de aluminio en una proporción de 3,25 Lf / 0,07 mg de Al³⁺. Los dos componentes se agitaron durante 15 hasta 20 minutos. El pH se ajustó a un pH de 6,1 ± 0,1. La mezcla se almacenó con agitación durante 16 hasta 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió una disolución de cloruro de sodio de concentración nominal 1500 mM (ad 150 mm). Después de la agitación de 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente, el pH se ajustó a 6,1 ± 0,1. El concentrado adsorbido se almacenó entre +2 °C y +8 °C durante al menos 14 días antes de la formulación final de la vacuna DTPw-HBV-IPV.

10

Diagrama de flujo de la adsorción del toxoide tetánico**Adsorción del antígeno de la Hepatitis B**

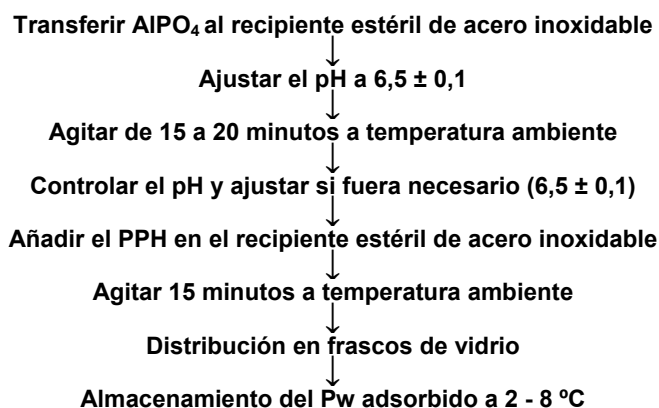
15 El AgHBs purificado a granel estéril se mezcló con una suspensión estéril de fosfato de aluminio con el fin de obtener una suspensión que contenía por cada 10 µg de AgHBs, 0,2 mg de Al³⁺ (como fosfato de aluminio), NaCl 150 mM en un volumen final de aproximadamente 50 µl.

Procedimiento de adsorción de AgHBs**Adsorción del antígeno Pw**

5 Se transfirió de manera aséptica la disolución de AlPO_4 a un recipiente estéril. La disolución se agitó durante 5 a 10 minutos y el pH se ajustó a $6,5 \pm 0,1$ con HCl 1M o NaOH 0,5 M directamente en el recipiente. La disolución se agitó durante 15 a 20 minutos. Se controló el pH ($6,5 \pm 0,1$) y se ajustó en caso de ser necesario.

10 Antes de la adsorción, se mezcló el material recogido combinado de pertussis (PPH) durante un mínimo de 15 minutos antes de usar y a continuación se añadió el PPH en el recipiente estéril que contenía el AlPO_4 . La suspensión se agitó durante un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente y podía almacenarse a temperatura ambiente durante la noche. Si el producto se almacenaba a temperatura ambiente durante la noche, tenía que resuspenderse durante un mínimo de 30 minutos antes de la distribución. Se tomaron muestras para su realizar las pruebas.

El Pw adsorbido a granel se distribuyó en frascos de vidrio estériles y se almacenó a 2-8 °C.

Diagrama de flujo de la adsorción de Pw

15

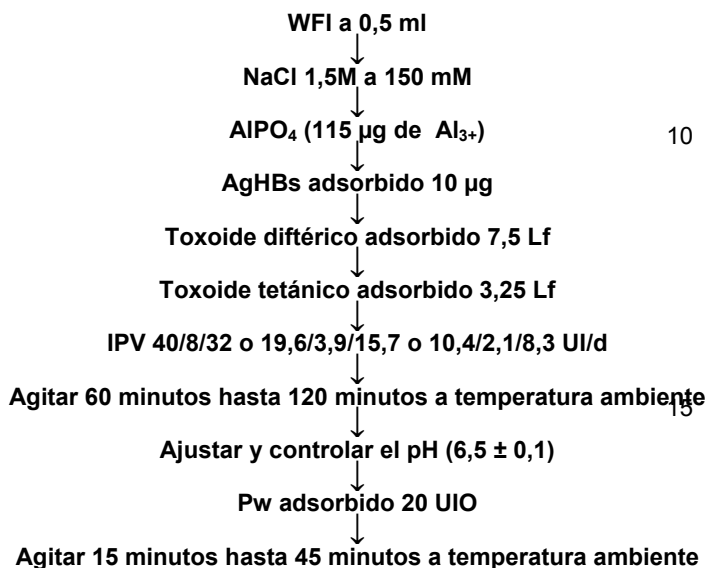
FORMULACIÓN FINAL DE DTPW-VHB-IPV

El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se mezcló la disolución de cloruro de sodio y el agua para inyecciones para alcanzar una concentración final de NaCl de 150 mM.
- 20 - Se añadió AlPO_4 para obtener una concentración de Al^{3+} libre de 0,115 mg/dosis.
- Se añadieron los concentrados de HEF, difteria y tétanos adsorbidos para obtener una concentración final de 10 µg de AgHBs, toxoide diftérico 7,5 Lf y toxoide tetánico 3,25 Lf por dosis de 0,5 ml.
- Se añadió IPV para obtener una concentración final de 40/8/32 o 19,6/3,9/15,7 o 10,4/2,1/8,3 UI/d.
- Se agitó suavemente durante 60 hasta 120 minutos a temperatura ambiente.
- 25 - Se ajustó el pH a $6,5 \pm 0,1$

- Se agitó durante 15 hasta 20 minutos a temperatura ambiente.
 - Se controló el pH: $6,5 \pm 0,1$
 - Se añadió el concentrado de Pw adsorbido para obtener una concentración final de 20 UIO por dosis de 0,5 ml.
 - Se agitó durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente.
- 5
- Se midió el pH.
 - El producto final a granel se almacenó entre $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta rellenar.

Diagrama de flujo de la formulación de la vacuna DTPw-HBV



20 **Ejemplo 6: Evaluación clínica de la vacuna de investigación DTPa-HB V-IPV/Hib con dosis reducidas de Hib y IPV**

Está previsto realizar un estudio exploratorio, de fase II, para evaluar la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad de 4 formulaciones diferentes de la vacuna de investigación DTPw-HBV-IPV/Hib de GSK Biologicals frente a la vacuna disponible en el mercado DTPa-HBV-IPV/Hib y las vacunas DTPw-HBV/Hib e IPV disponibles en el mercado que se administran conjuntamente.

25 • **Indicación/poblaciones:**

Inmunización primaria de niños sanos en la primera semana de vida contra la difteria, el tétanos, la tos ferina, la hepatitis B, la poliomielitis y enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b.

• **Grupos de estudio:**

- Vacuna DTPa-HBV-IPV (49% de la dosis estándar) / Hib 5 µg
- 30 Vacuna DTPa-HBV-IPV (49% de la dosis estándar) / Hib 2,5 µg
- Vacuna DTPa-HBV-IPV (26% de la dosis estándar) / Hib 5 µg
- Vacuna DTPa-HBV-IPV (26% de la dosis estándar) / Hib 2,5 µg
- Vacuna DTPa-HBV-IPV/Hib
- Vacunas DTPw-HBV/Hib + IPV

35 • **Objetivos primarios:**

Evaluar la inmunogenicidad de las vacunas candidatas DTPa-HBV-IPV/Hib en términos de la respuesta al PRP y a los tres antígenos de poliovirus (polio 1, 2 y 3).

- **Objetivos secundarios:**

Inmunogenicidad

Evaluar la inmunogenicidad de todas las vacunas del estudio en términos de respuesta a todos los antígenos de las vacunas.

5 **Reactogenicidad**

Evaluar la reactogenicidad y la seguridad de las vacunas del estudio, en términos de síntomas inducidos, síntomas no inducidos y acontecimientos adversos graves.

- **Programa de vacunación**

10 Programa de vacunación primaria de tres dosis a las 6 semanas de edad. Todos los sujetos reciben una dosis de Hepatitis B al nacer.

- **País:**

TBC

- **Extracción de muestras de sangre:**

Antes y después de la vacunación 3.

15 • **Formulaciones de vacunas:**

La vacuna está constituida por dos partes: una parte líquida (DTPa-HB-IPV) y una parte liofilizada (Hib).

D, T, PT, FHA, PRN y AgHBs son preadsorbidos con anterioridad. Se mezcla agua y NaCl con los diferentes antígenos. La mezcla se agita para homogeneizar y se ajusta el pH. La composición final de la parte DTPa-HB-IPV de la vacuna se presenta en la tabla a continuación.

20 **Tabla 17. Composición para una dosis humana de 0,5 ml de DTPa-HBV-IPV**

Componente	Cantidad
Toxoide D	25 Lf
Toxoide T	10 Lf
PT	25 µg
FHA	25 µg
PRN	8 µg
AgHBs	10 µg
IPV tipo 1	40 o 19,6 o 10,4 UI
IPV tipo 2	8 o 3,9 o 2,1 UI
IPV tipo 3	32 o 15,7 o 8,3 UI
Al ³⁺	De 700 a 790 µg

Hib es preadsorbido. El Hib preadsorbido se mezcla con sacarosa o lactosa antes de liofilizar. La cantidad de Hib debe ser de 2,5 o 5 o 10 µg por dosis para seres humanos. El contenido de aluminio será de 30 a 120 µg de Al³⁺ como AlPO₄ por dosis para seres humanos.

25

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna IPV que comprende:
- (a) toxoide diftérico;
 - (b) toxoide tetánico;
- 5 (c) células completas muertas de *Bordetella pertussis*; o dos o más componentes acelulares de pertussis (Pa) (por ejemplo toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y pertactina (PRN)), y
- (d) poliovirus tipo 1 inactivado en una dosis superior a 10 unidades de antígeno D e inferior a 20 unidades de antígeno D,
- en la que la vacuna está sustancialmente libre de tiomersal.
- 10 2. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el poliovirus tipo 1 inactivado está presente en el 26-49%, 30-45%, 33-40% o 35-37% de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D.
3. La vacuna de la reivindicación 1 o 2, que además comprende poliovirus tipo 3 inactivado en una dosis de 8-20 unidades de antígeno D, 9-19 unidades de antígeno D, 10-18 unidades de antígeno D, 11-17 unidades de antígeno D, 12-16 unidades de antígeno D o 13-15 unidades de antígeno D; por ejemplo alrededor de o exactamente 13
- 15 unidades de antígeno D.
4. La vacuna de la reivindicaciones 1-3, que además comprende poliovirus tipo 2 inactivado en una dosis de 2-4 unidades de antígeno D.
5. La vacuna de las reivindicaciones 1-4, en la que uno o más de los toxoides diftéricos, el toxoide tetánico, las células completas muertas de *Bordetella pertussis*, los dos o más componentes acelulares de pertussis, el poliovirus tipo 1 inactivado, el poliovirus tipo 2 inactivado o el poliovirus tipo 3 inactivado es adsorbido sobre hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o una mezcla de ambos.
- 20 6. La vacuna de la reivindicación 1-5, que además comprende antígeno de superficie de la hepatitis B, está sustancialmente libre de tiomersal, opcionalmente adsorbida sobre fosfato de aluminio.
7. La vacuna de las reivindicaciones 1-6, que además comprende un conjugado de una proteína vehículo y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), opcionalmente adsorbida sobre fosfato de aluminio o no adsorbida sobre un adyuvante.
- 25 8. La vacuna de las reivindicaciones 1-7, que además comprende uno o más de:
- (i) uno o más conjugados de una proteína vehículo y un sacárido capsular de una bacteria seleccionada del grupo *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W y *Neisseria meningitidis* tipo Y;
 - (ii) una vesícula de membrana externa o LOS de *Neisseria meningitidis* tipo B (MenB) o un sacárido capsular de MenB conjugado;
 - (iii) un sacárido Vi de *Salmonella typhi* conjugado a una proteína vehículo; o
 - (iv) un antígeno de hepatitis A,
- 30 en la que cada componente se adsorbe opcionalmente sobre hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o una mezcla de ambos; o en la que el componente i), ii) o iii) opcionalmente no está adsorbido sobre un adyuvante.
9. El uso de la vacuna de las reivindicaciones 1-8 en la fabricación de un medicamento para la prevención de la enfermedad causada por el poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bordetella pertussis*.
- 40 10. El uso de la vacuna de las reivindicaciones 1-8 en la fabricación de un medicamento para la prevención de la enfermedad causada por el poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bordetella pertussis* y opcionalmente uno o más de Hepatitis B, *Haemophilus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi* y Hepatitis A.
11. La vacuna o el uso de las reivindicaciones 1-10, en el que el IPV tipo 1, es de la cepa Mahoney.
- 45 12. La vacuna o el uso de las reivindicaciones 1-11, en el que el IPV tipo 2, si está presente, es de la cepa MEF-1.
13. La vacuna, el procedimiento o el uso de las reivindicaciones 1-12, en el que el IPV tipo 3, si está presente, es de la cepa Saukett.

FIGURA 1

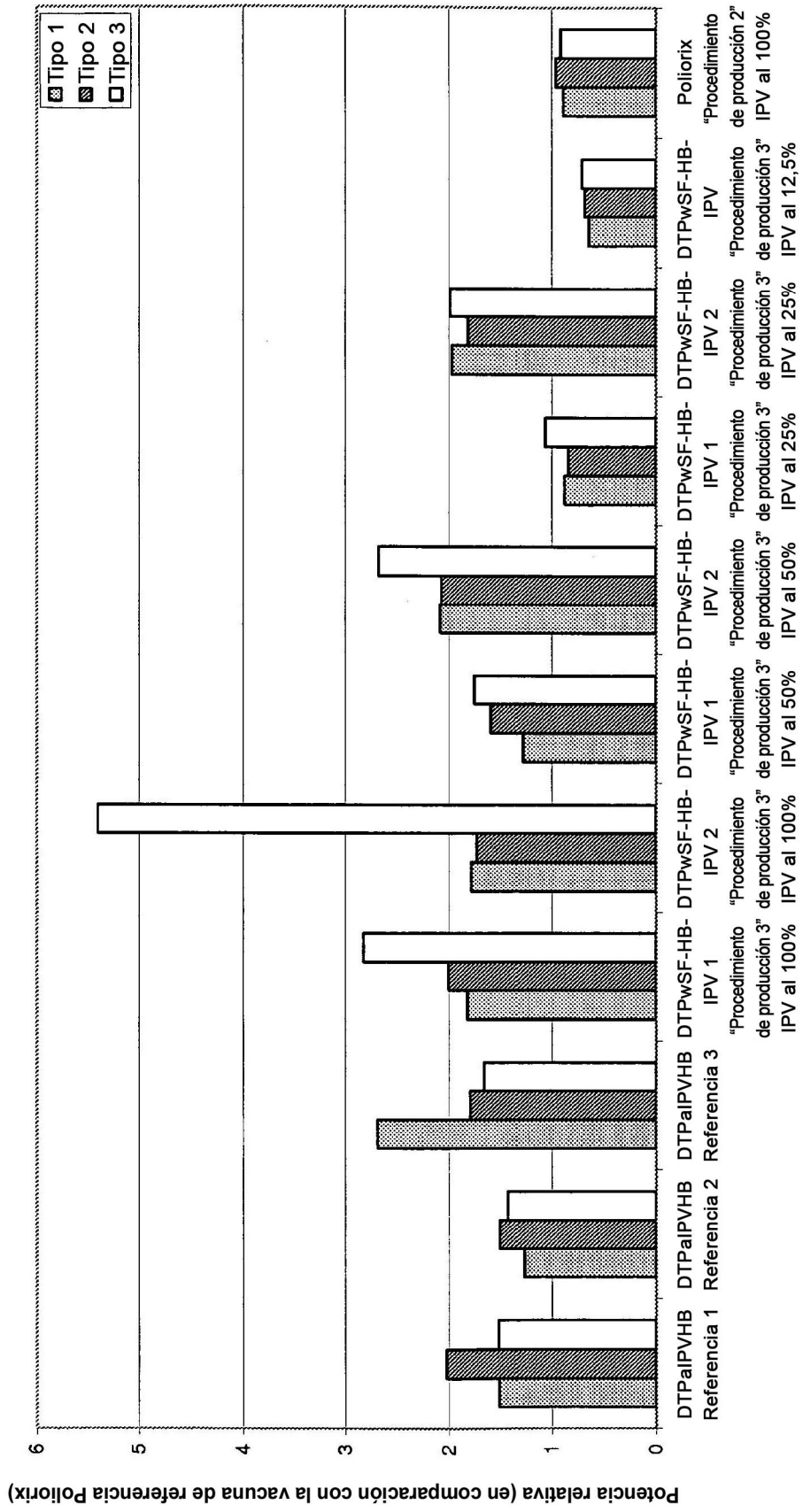


FIGURA 2

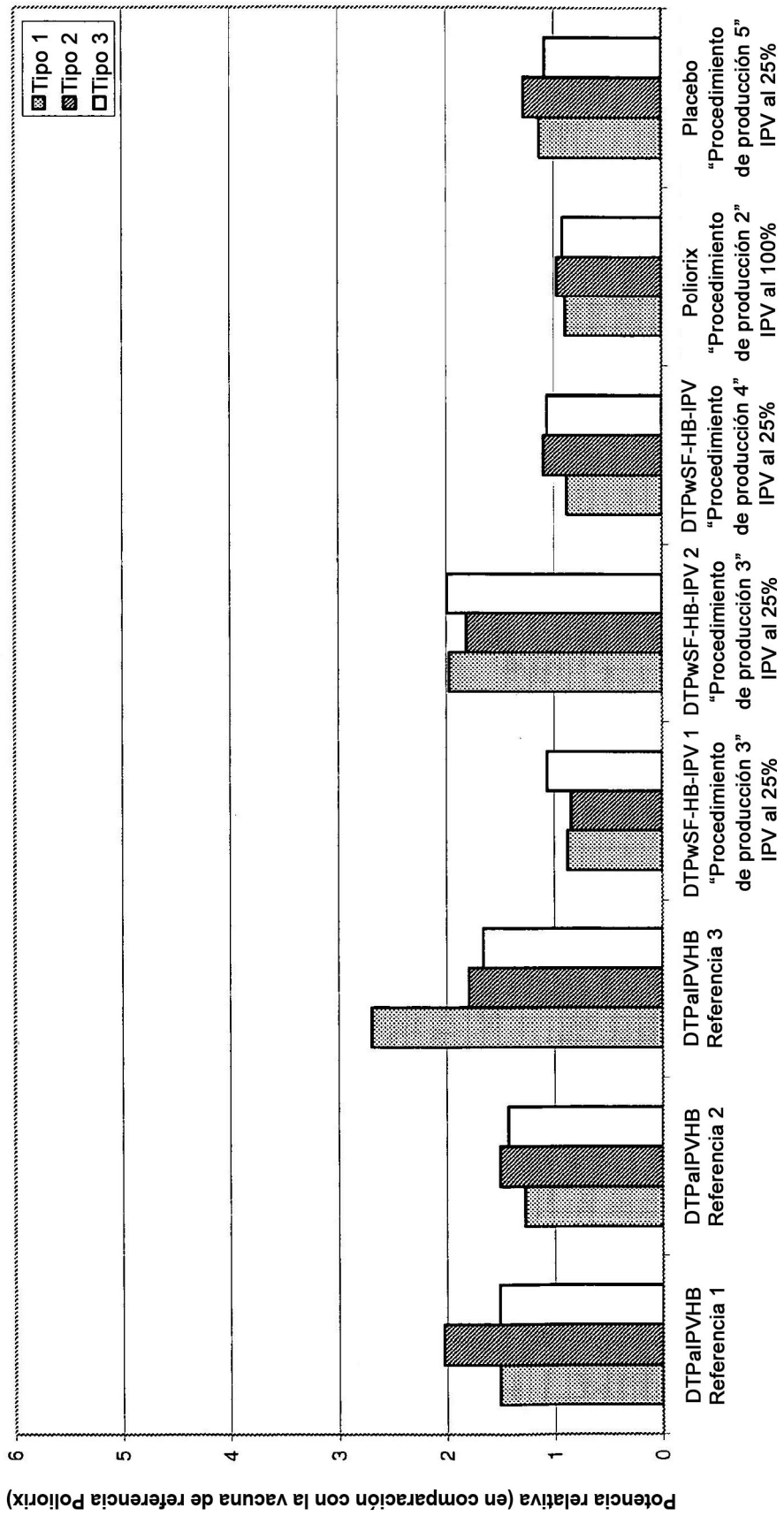
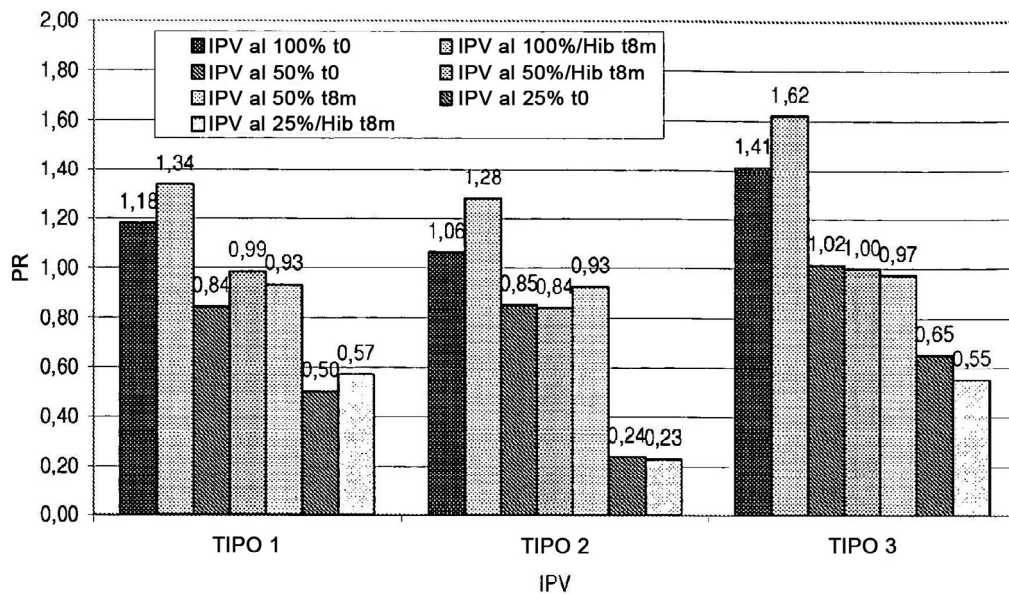


FIGURA 3

a)



b)

FIGURA 3

