



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 717**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05738559 .3**
96 Fecha de presentación : **29.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1740217**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54 Título: **Vacunación meningocócica conjugada.**

30 Prioridad: **30.04.2004 GB 0409750**
14.01.2005 GB 0500787

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2011

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Marshall, Cameron**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 717 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

Vacunación meningocócica conjugada

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a vacunas contra *Neisseria meningitidis*. En particular, se refiere a vacunas basadas en sacáridos capsulares conjugados de serogrupos meningocócicos múltiples.

Antecedentes de la técnica

10 Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado doce serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z). El grupo A es el patógeno más frecuentemente implicado en enfermedades epidémicas en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la inmensa mayoría de casos en Estados Unidos y en países más desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables de los casos restantes en Estados Unidos y en países desarrollados.

15 Desde hace muchos años, se conoce una vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y y W135 [1,2]. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos, induce una escasa respuesta inmunológica y una corta duración de protección y no puede usarse en niños (por ejemplo ref. 3] porque los polisacáridos son antígenos independientes de linfocitos T que inducen una débil respuesta inmunológica que no puede reforzarse. En esta vacuna, los polisacáridos no están conjugados [4].

Las vacunas conjugadas contra el serogrupo C se han aprobado para el uso humano e incluyen Menjugate™ [5], Meningitec™ y NeisVac-C™. Se conocen mezclas de conjugados de los serogrupos A+C [6-8] y se han descrito mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y [9-13].

20 Aunque los conjugados meningocócicos se conocen bien, aún no se han adaptado a los programas de inmunización pediátricos existentes, en los que, en países desarrollados, participa típicamente: la vacuna contra la hepatitis B al nacer y, a partir de los 2 meses, todos los conjugados difteria/tétano/tos ferina (D-T-T), *H. influenzae* de tipo b (Hib), poliovirus inactivados y conjugados de neumococos a los 2 meses.

25 Sin embargo, cuando se añaden vacunas conjugadas a programas de inmunización existentes, debe abordarse el problema de la supresión epitópica inducida por vehículo (o "supresión por vehículo", como se conoce generalmente), particularmente la supresión que surge de la sensibilización del vehículo. "La supresión por vehículo" es el fenómeno mediante el cual la preinmunización de un animal con una proteína de transporte le previene de una provocación tardía de una respuesta inmunológica contra un nuevo epítipo antigénico que está presente en ese vehículo [14].

30 Como se describe en la referencia bibliográfica 15, cuando varios antígenos de vacunas contienen el mismo componente proteico (usándose como un inmunógeno y/o como una proteína de transporte en un conjugado) entonces existe la posibilidad de interferencia entre aquellos antígenos. En la referencia bibliográfica 15, la respuesta inmunológica contra un antígeno, que se conjugó con un vehículo de anatoxina tetánica (Ta), se suprimió por inmunidad preexistente contra la Ta.

35 La referencia bibliográfica 16 describe cómo una combinación de vacunas contra D-T-T con una vacuna conjugada Hib afectó de manera adversa cuando el vehículo para el conjugado Hib era el mismo que el antígeno del tétano de la vacuna D-T-T. Los autores llegan a la conclusión de que este fenómeno de "supresión por vehículo", que surge de la interferencia por un vehículo de proteína común, debe tenerse en cuenta cuando se introducen vacunas que incluyen conjugados múltiples.

40 A diferencia de las referencias bibliográficas 15 y 16, la referencia bibliográfica 17 describe que la sensibilización con anatoxina tetánica no tuvo un impacto negativo sobre la respuesta inmunológica contra un conjugado Ta-Hib administrado posteriormente, pero se ha observado supresión en pacientes con anticuerpos anti-Ta adquiridos por vía materna. Sin embargo, en la referencia bibliográfica 18, se describe un efecto de "supresión epitópico" para un conjugado peptídico basado en Ta en pacientes que poseían anticuerpos anti-Ta existentes de la vacunación antitetánica.

45 En la referencia bibliográfica 19, se sugirió que un conjugado que poseía CRM197 (un mutante no tóxico de la toxina diftérica) como vehículo podía ser ineficaz en niños que no habían recibido previamente la toxina diftérica como parte de una vacuna (por ejemplo como parte de una vacuna contra D-T-T o D-T). Este trabajo se desarrolló posteriormente en la referencia 20, donde se observó que persistía un efecto de sensibilización con vehículo por inmunización D-T para una inmunización posterior con conjugados Hib.

50 En la referencia bibliográfica 21, los autores descubrieron que la preinmunización con una proteína de transporte de anatoxina tetánica o diftérica reducía el aumento en cuanto a los niveles de anticuerpos anti-Hib después de una inmunización posterior con el sacárido capsular Hib conjugado a estos vehículos, afectando de igual modo con IgG1 e IgG2. Las respuestas contra las partes vehículo de los conjugados también se suprimieron. Adicionalmente, se

observó una supresión específica no epitópica más general, ya que se observó que la preinmunización con un conjugado afectaba a respuestas inmunes contra las partes del vehículo y del sacárido de un segundo conjugado que se administró cuatro semanas después.

5 En la referencia 22 se describe el uso de diferentes proteínas de transporte en una sola vacuna neumocócica conjugada multivalente, en la que se usan múltiples vehículos para evitar la supresión del vehículo. Los autores pronostican que, en una vacuna conjugada multivalente, existe una carga máxima de una proteína de transporte que puede tolerarse sin suscitar interferencia negativa. En la referencia bibliográfica 23 se describió que las vacunas neumocócicas conjugadas que incluían proteínas de transporte mixtas provocaban, en paralelo a la respuesta anti-neumocócica, respuestas de refuerzo involuntarias contra los vehículos.

10 En la referencia bibliográfica 24, una investigación sobre si podían administrarse refuerzos bien contra la difteria o el tétanos con conjugados del serogrupo C meningocócicos monovalentes, se descubrió que las titulaciones contra el conjugado meningocócico se reducían cuando el vehículo era el vehículo anatoxina tetánica y el paciente había recibido inmunización previa con una vacuna que contenía el tétano.

15 Finalmente, la referencia bibliográfica 25 describe que “antes de la exposición a la proteína de transporte se puede potenciar o suprimir la respuesta del anticuerpo a polisacáridos administrados en conjugados de proteína-sacárido”. Los conjugados usados en la referencia bibliográfica 25 usan, como proteína de transporte, la anatoxina tetánica o el mutante CRM197.

20 Por tanto, la situación con respecto a la sensibilización y/o supresión por vehículo es confusa y continúa sin aclarar si cualquier conjugado particular experimentará supresión por vehículo o se beneficiará de un aumento de sensibilización por vehículo. Las vacunas meningocócicas conjugadas no estarán en una posición para integrarse o añadirse a los programas de inmunización pediátricos existentes hasta que no se aborde este problema. Adicionalmente, dado que los conjugados meningocócicos deben administrarse como mezclas tetravalentes (es decir cuatro conjugados diferentes) entonces la posibilidad de supresión por vehículo se vuelve incluso más arriesgada.

25 Además del problema de sensibilización con un vehículo que tiene un impacto negativo sobre respuestas inmunológicas contra conjugados sacáridos, también puede ocurrir lo contrario, es decir, la inmunización con un conjugado puede tener un impacto negativo sobre respuestas inmunológicas contra el vehículo [26].

30 El documento WO 03/094834 describe composiciones inmunogénicas que comprenden (a) un antígeno sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* y (b) un adyuvante de quitosano. Se dice que las composiciones comprenden preferentemente (c) uno o más antígenos adicionales y/o (d) uno o más adyuvantes adicionales. Se dice que las composiciones son particularmente adecuadas para la administración en la mucosa, incluyendo la administración intranasal. El documento WO 03/094834 también describe composiciones inmunogénicas para administración en la mucosa que comprenden sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. Se dice que, en las composiciones de la invención, se prefiere que los sacáridos capsulares
35 estén conjugados a una proteína (o proteínas) de transporte y/o que sean oligosacáridos. Se dice que los antígenos de oligosacáridos conjugados son particularmente preferidos.

Divulgación de la invención

40 La referencia bibliográfica 27 sugiere que, en las vacunas meningocócicas conjugadas, la supresión por vehículo debe afrontarse con el uso de más de un tipo de proteína de transporte. En particular, la referencia bibliográfica 27 sugiere que la proteína D de *H. influenzae* debería usarse como proteína de transporte para conjugados meningocócicos, siendo también una posibilidad la anatoxina tetánica (Ta). Para evitar la supresión epitópica, la proteína D es también el vehículo de elección en la referencia bibliográfica 28. De manera similar, la referencia bibliográfica 29 sugiere que las fimbrias de *Bordetella pertussis* deberían usarse como vehículo para evitar la
45 supresión por vehículo en vacunas conjugadas multivalentes. Por otro lado, se ha descubierto que la anatoxina diftérica (Ta) y sus derivados pueden usarse de manera inocua como vehículo para conjugados sacáridos meningocócicos, incluso cuando se administran conjugados meningocócicos múltiples al mismo tiempo. Ninguno de los conjugados del serogrupo C meningocócicos monovalentes estudiados en la referencia bibliográfica 24 usan un vehículo de Da.

50 Además, la referencia bibliográfica 27 también sugiere que las vacunas conjugadas meningocócicas deberían administrarse al mismo tiempo como vacunas D-T-T-Hib (por ejemplo véase el ejemplo 3), de manera que no exista exposición previa a la proteína de transporte de los conjugados meningocócicos. Por otro lado, ahora se ha descubierto que los conjugados meningocócicos pueden administrarse a pacientes incluso cuando ya han recibido la proteína de transporte, bien en forma de un inmunógeno previo (por ejemplo en una inmunización contra D-T-T o D-T) o como una proteína de transporte previa (por ejemplo en una vacuna conjugada Hib o conjugada neumocócica).
55 El estudio previo de supresión epitópica inducida por vehículo en vacunas conjugadas del serogrupo C monovalentes [24] no consideraba el efecto de ninguna administración de conjugados anterior.

También contrastando con la referencia bibliográfica 27, la capacidad de un paciente para provocar una respuesta inmunitaria contra un conjugado meningocócico, incluso cuando ya ha recibido un conjugado diferente, contrasta con

la referencia bibliográfica 21.

Por tanto la invención proporciona una composición que comprende: (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (c) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica, para su uso en un procedimiento para inmunizar a un paciente contra una enfermedad ocasionada por *Neisseria meningitidis*, que comprende la etapa de administrar al paciente la composición, en el que el paciente se ha preinmunizado con (a) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica.

La invención también proporciona el uso de: (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactivo de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactivo de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (c) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactivo de manera cruzada con la anatoxina diftérica y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactivo de manera cruzada con la anatoxina diftérica, en la preparación de un medicamento para inmunizar a un paciente contra una enfermedad ocasionada por *Neisseria meningitidis* en el que el paciente se ha preinmunizado con (a) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica y/o (b) un conjugado (i) de un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica.

La enfermedad meningocócica es preferentemente meningitis, más preferentemente meningitis bacteriana y más preferentemente meningitis meningocócica. Por lo tanto la invención puede usarse para proteger contra infecciones meningocócicas que causan meningitis.

Cuando el antígeno de la preinmunización es un derivado de una anatoxina diftérica que permanece inmunológicamente reactivo de manera cruzada con la Da, entonces el derivado es preferentemente CRM197.

El paciente preinmunizado

El paciente a inmunizar se ha preinmunizado con: (a) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica y/o (b) un conjugado (i) de un sacárido capsular de un organismo distinto de *Neisseria meningitidis* y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica. La preinmunización típica habrá incluido, un antígeno de anatoxina diftérica; un conjugado de sacárido capsular Hib usando un vehículo de anatoxina diftérica o CRM197 y/o un conjugado sacárido capsular neumocócico que usa un vehículo de anatoxina diftérica o CRM197.

El paciente habrá recibido al menos una (por ejemplo 1, 2, 3 o más) dosis del antígeno (o antígenos) de preinmunización y esta dosis (o la primera de dosis múltiples) se habrá administrado al paciente la menos seis (por ejemplo 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48, 60, 120, 180, 240, 300 o más) meses antes de la inmunización con los conjugados meningocócicos de acuerdo con la invención. En un grupo de pacientes preferido, la preinmunización se realiza a los 3 años del nacimiento por ejemplo a los 2 años del nacimiento, al año del nacimiento, a los 6 meses del nacimiento o incluso a los 3 meses, 2 meses o 1 mes del nacimiento.

El paciente a inmunizar de acuerdo con la invención será típicamente un ser humano. El ser humano tendrá generalmente al menos 1 mes de edad, por ejemplo al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 2 años, al menos 5 años, al menos 11 años, al menos 17 años, al menos 46 años, al menos 55 años, etc. Un grupo de pacientes preferido tiene al menos 6 meses de edad. Otro grupo de pacientes preferido es el grupo de 2 a 55 años de edad y otro grupo de pacientes preferido es el grupo de 11 a 55 años de edad. Un conjunto de pacientes preferido adicional es de menos de 11 años, por ejemplo, de 2 a 11 años. Sin embargo, en todos los casos, independientemente de la edad, el paciente se habrá preinmunizado como se define en el presente documento.

Cuando el antígeno de preinmunización es una anatoxina diftérica entonces el paciente habrá recibido típicamente la anatoxina como antígeno 'D' en una preinmunización D-T-T o D-T. Dichas inmunizaciones se proporcionan

típicamente a niños recién nacidos a los 2, 3 y 4 meses de edad. Cuando la inmunización incluye una vacuna anti-tos ferina, esta vacuna puede ser una vacuna anti-tos ferina celular o de célula completa ('Pw'), pero preferentemente es una vacuna anti-tos ferina acelular ('Pa'). Las vacunas Pa para preinmunización generalmente incluirán uno, dos o tres de los siguientes antígenos de *B. pertussis* bien conocidos y bien caracterizados: (1) anatoxina tosferínica ('TA'), destoxicada por medios químicos o por mutagénesis dirigida, por ejemplo el mutante '9K/129G' [30]; (2) hemaglutinina filamentosa ('FHA'); (3) pertactina (conocida también como 'proteína de membrana externa de 69 kiloDalton'). Las vacunas anti-tos ferina acelulares también pueden incluir aglutinógeno 2 y/o aglutinógeno 3. El antígeno 'T' en una preinmunización D-T-T es típicamente una anatoxina tetánica.

Cuando el antígeno de preinmunización es una anatoxina diftérica entonces el paciente también puede, o como alternativa, haber recibido la anatoxina como proteína de transporte de un conjugado sacárido-proteína. Dichos conjugados incluyen el conjugado 'PRP-D' Hib (véase la Tabla 14-7 o la referencia bibliográfica 32), por ejemplo el producto ProHIBIT™.

Cuando el antígeno de preinmunización es CDM197 entonces el paciente se habrá preinmunizado típicamente con un conjugado Hib y/o un conjugado neumocócico multivalente. Dichas inmunizaciones se proporcionan típicamente a niños recién nacidos a los 2, 3 y 4 meses de edad. Los conjugados de Hib que usan un vehículo CRM197 incluyen los conjugados 'HbOC' [Tabla 14-7 de la referencia bibliográfica 32] por ejemplo el producto HibTITER™. Los conjugados neumocócicos que usan un vehículo CRM197 incluyen las mezclas 7- valentes de PCV7 por ejemplo la vacuna PrevNar™ [31]. El paciente también puede haberse preinmunizado con un conjugado meningocócico ('MenC') del serogrupo C. Los conjugados MenC que usan vehículo CRM197 incluyen Meninvact™/Menjugate™ [5] y Meningitec™. Preferentemente, sin embargo, el paciente se ha preinmunizado con conjugado Hib y/o neumocócico, pero no con un conjugado MenC. Si el paciente se ha preinmunizado con un conjugado MenC entonces la vacuna administrada de acuerdo con la presente invención puede o no incluir un conjugado del serogrupo C.

Cuando la preinmunización se realiza con un antígeno conjugado entonces el paciente habrá recibido casi inevitablemente una pequeña cantidad de anatoxina diftérica (o derivado) libre como resultado de una contaminación de bajo nivel del conjugado (causada, por ejemplo, por hidrólisis del conjugado durante el almacenamiento) pero esta pequeña cantidad no se habrá adecuado típicamente para proporcionar una respuesta inmunológica significativa.

La anatoxina diftérica es una proteína bien conocida y bien caracterizada [véase, por ejemplo, el capítulo 13 de la referencia bibliográfica 32] que puede obtenerse tratando la exotoxina de *Corynebacterium diphtheriae* ribosilante de ADP con un producto químico inactivante, tal como formalina o formaldehído. CRM197 también se conoce bien y está bien caracterizado [33-36] y se ha usado ampliamente como un vehículo en vacunas de sacáridos conjugados. CRM197 y Da comparten muchos epitopos vehículo.

El resultado de la preinmunización es que el sistema inmunológico del paciente se ha expuesto a antígenos de preinmunización. Para la preinmunización con anatoxina diftérica (Da), esto generalmente significa que el paciente habrá provocado una respuesta de anticuerpos anti-Da (típicamente para proporcionar una titulación anti-Da > 0,01 UI/ml) y poseerá memoria de linfocitos B y/o T específica para Da, es decir, la preinmunización con Da es típicamente adecuada para suscitar, en el paciente, una respuesta inmunológica anamnésica anti-Da. Para la preinmunización en la que Da (o derivado) es un vehículo para un sacárido dentro de un conjugado entonces la preinmunización habrá suscitado una respuesta anti-sacárido y el paciente poseerá memoria específica de linfocitos B y/o T para el sacárido es decir la preinmunización es típicamente adecuada para provocar una respuesta inmunológica anti-sacárido anamnésica en el paciente. La preinmunización era preferentemente adecuada para provocar en el paciente inmunidad protectora, por ejemplo, contra la enfermedad de la difteria.

Por tanto, los pacientes a inmunizar de acuerdo con la presente invención son distintos de los pacientes en general, ya que son miembros de un subconjunto de la población general cuyo sistema inmunitario ya ha creado una respuesta inmunitaria contra antígenos de preinmunización, de manera que la inmunización de acuerdo con la presente invención con un conjugado meningocócico que incluye un vehículo de anatoxina diftérica (o derivado) provoca en el subconjunto una respuesta inmunitaria diferente a la de pacientes que no han creado previamente ninguna respuesta inmunológica contra los antígenos de preinmunización. Los pacientes preferidos son los que se han preinmunizado con Da (o derivado) como el vehículo de un conjugado (particularmente de un conjugado Hib). Los pacientes particularmente preferidos se han preinmunizado con Da (o derivado) como el vehículo de un conjugado y también con Da como un inmunógeno no conjugado.

Así como se ha preinmunizado con una anatoxina diftérica (o derivado), en forma conjugada o no conjugada, el paciente puede haberse pre-inmunizado con otros antígenos. Dichos antígenos incluyen, pero sin limitación: antígeno (o antígenos) de tos ferina - véase anteriormente; anatoxina tetánica - véase anteriormente; *Haemophilus influenzae* de tipo B - véase anteriormente; antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg); poliovirus, tal como una vacuna contra poliovirus inactivada (IPV); *Streptococcus pneumoniae* - véase anteriormente; virus de la gripe; BCG; antígenos del virus de la hepatitis A; virus del sarampión; virus de las paperas; virus de la rubeola; virus de la varicela; etc.

El paciente puede o no haberse preinmunizado con uno o más conjugados meningocócicos. En algunas realizaciones preferidas, en el momento en que un paciente recibe por primera vez un conjugado meningocócico, este ya estaba preinmunizado con Da (o derivado). En otras realizaciones, se administra un conjugado meningocócico a un paciente que ya se había preinmunizado tanto con (i) Da o un derivado como con (ii) un conjugado meningocócico.

Los conjugados

La invención inmuniza pacientes con sacáridos conjugados. La conjugación se usa para potenciar la inmunogenicidad de sacáridos, ya que los transforma de antígenos T independientes en antígenos T dependientes, permitiendo de esta manera la sensibilización de memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil en vacunas pediátricas [por ejemplo, referencia bibliográfica 37] y se conoce bien en la técnica [revisar, por ejemplo, las referencias bibliográficas 38 a 46].

La composición usada de acuerdo con la invención comprende al menos dos conjugados meningocócicos, en la que cada conjugado comprende una proteína de transporte de anatoxina diftérica (o derivado) y el sacárido capsular. Los sacáridos capsulares se seleccionan de los serogrupos A, C, W135 e Y meningocócicos, de manera que las composiciones incluyen sacáridos de 2, 3 ó 4 de estos cuatro serogrupos. Las composiciones específicas comprenden sacáridos de: serogrupos A y C; serogrupos A y W135; serogrupos A e Y; serogrupos C y W135; serogrupos C e Y; serogrupos W135 e Y; serogrupos A y C y W135; serogrupos A y C e Y; serogrupos A y W135 e Y; serogrupos C y W135 e Y; serogrupos A y C y W135 e Y. Las composiciones más preferidas son las que incluyen sacáridos de los cuatro serogrupos.

Los sacáridos capsulares de cada uno de estos cuatro serogrupos están bien caracterizados. El sacárido capsular del meningococo del serogrupo A es un homopolímero de ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-unido a N-acetil-D-manosamina-1-fosfato, con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. Los grupos acetilo pueden sustituirse con grupos de bloqueo para impedir la hidrólisis [47] y dichos sacáridos modificados son aún sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la presente invención. El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-unido a ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico, o 'NeuNAc'). La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en los restos C-7 y/o C-8 del ácido siálico, pero aproximadamente el 15% de aislados clínicos carece de estos grupos O-acetilo [48,49]. La estructura del sacárido se escribe $\rightarrow 9$ -Neu p NAc 7/8 OAc-($\alpha 2 \rightarrow$). El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades del disacárido ácido siálico-galactosa. Al igual que el sacárido del serogrupo C, tiene O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [50]. La estructura se escribe: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$). El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135 excepto que las unidades de repetición del disacárido incluyen glucosa en lugar de galactosa. Al igual que el serogrupo W135, tiene una O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [50]. La estructura del serogrupo Y se escribe: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$).

Los sacáridos usados de acuerdo con la invención pueden estar O-acetilados como se ha descrito anteriormente (por ejemplo con el mismo modelo de O-acetilación al observado en sacáridos capsulares naturales) o pueden estar parcial o totalmente des-O-acetilados en una o más posiciones de los anillos sacáridos o pueden estar hiper-O-acetilados con respecto a los sacáridos capsulares originales.

Los sacáridos usados de acuerdo con la invención son preferentemente más cortos que los sacáridos capsulares naturales observados en bacterias. Por lo tanto los sacáridos están preferentemente despolimerizados, produciéndose la despolimerización después de la purificación pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. Un procedimiento de despolimerización preferido implica el uso del peróxido de hidrógeno [9]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (por ejemplo, para proporcionar una concentración final de H₂O₂ del 1%) y después se incuba la mezcla (por ejemplo, aproximadamente a 55°C) hasta conseguir una reducción deseada de la longitud de cadena. Otro procedimiento de despolimerización implica la hidrólisis ácida [10]. Los expertos en la materia conocen otros procedimientos de despolimerización. Los sacáridos usados para preparar conjugados para su uso de acuerdo con la invención pueden obtenerse mediante cualquiera de estos procedimientos de despolimerización. La despolimerización puede usarse para proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de la cadena para el manejo físico de los sacáridos.

Las proteínas de transporte típicas para su uso en conjugados son toxinas o anatoxinas bacterianas tales como toxina diftérica (o su mutante CRM₁₉₇) y toxina tetánica. Otras proteínas de transporte conocidas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis*, péptidos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas de tos ferina, citocinas, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, proteínas artificiales que comprenden epítopos de linfocitos T CD4⁺ humanos múltiples de diversos antígenos derivados de patógenos, proteína D de *H. influenzae*, proteína de superficie neumocócica PspA, proteínas captadoras de hierro, toxina A o B de *C. difficile*, etc. Sin embargo, de acuerdo con la invención, los conjugados meningocócicos incluyen una proteína de transporte de anatoxina diftérica (o derivado, tal como CRM197). Se prefiere la conjugación covalente.

En las composiciones es posible usar más de una proteína de transporte. Por lo tanto pueden usarse diferentes proteínas de transporte para diferentes serogrupos, por ejemplo, sacáridos del serogrupo A podrían conjugarse con

CRM197 mientras que sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con la anatoxina diftérica. También es posible el uso de más de una proteína de transporte para un antígeno sacárido particular, por ejemplo, sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM197 y otros conjugados con anatoxina diftérica. Sin embargo, en general, en la composición se prefiere el uso de la misma proteína de transporte para todos los sacáridos meningocócicos y más preferentemente para todos los sacáridos (es decir, incluyendo cualquier conjugado no meningocócico que pudiera estar presente). Se prefiere que las composiciones de la invención no incluyan ninguna proteína de transporte de anatoxina tetánica. Cuando la composición incluye una proteína de transporte de anatoxina diftérica entonces se prefiere que no se incluya ninguna proteína de transporte CRM197.

Una sola proteína de transporte podría transportar más de un antígeno sacárido [51]. Por ejemplo, una sola proteína de transporte podría conjugarse con sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general, se prefiere tener distintos conjugados para cada serogrupo. Los conjugados se mezclan preferentemente para proporcionar sustancialmente una proporción 1:1:1:1 (medida como masa de sacárido) por ejemplo la masa de cada sacárido de los serogrupos está dentro de $\pm 10\%$ unos con respecto a otros. Una cantidad típica de antígeno meningocócico por serogrupo en una composición está entre 1 μg y 20 μg por ejemplo entre 2 y 10 μg por serogrupo o aproximadamente 4 μg . Como una alternativa para una proporción 1:1:1:1, puede usarse una doble dosis del serogrupo A (2:1:1:1).

Se prefieren conjugados con una proporción sacárido:proteína (p/p) de entre 1:15 (por ejemplo proteína en exceso) y 15:1 (es decir sacárido en exceso), preferentemente entre 1:10 y 10:1, más preferentemente entre 1:5 y 5:1. Se prefiere el exceso de proteína de transporte. Se prefieren conjugados con una proporción sacárido:proteína de aproximadamente 1:12 o aproximadamente 1:6 o aproximadamente 1:3, particularmente cuando el vehículo es Da una proporción 1:3 es más preferida.

Los conjugados pueden usarse junto con una proteína de transporte libre [52]. Sin embargo, cuando en una composición de la invención existe una proteína de transporte determinada en forma conjugada y libre, la forma no conjugada preferentemente no supera el 5% de la cantidad total de la proteína de transporte en la composición en su conjunto, y más preferentemente presente en menos del 2% en peso. De manera similar, es preferente que el sacárido no conjugado no supere el 15% en peso de la cantidad total de sacárido.

Cuando sea necesario puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier engarce adecuado.

El sacárido se activará o se funcionalizará típicamente antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio-tetrafluoroborato [53, 54, etc.]). Otros procedimientos adecuados usan carbodiimidias, hidracinas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzóico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción de la referencia bibliográfica 44).

Pueden realizarse enlaces mediante un grupo de engarce usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias bibliográfica 55 y 56. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, el acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo de engarce del ácido adípico y después el acoplamiento de una proteína al otro extremo del grupo de engarce del ácido adípico [42, 57, 58]. Otros engarces incluyen β -propionamido [59], nitrofenil-etilamina [60], haluros de haloacilo [61], enlaces glucosídicos [62], ácido 6-aminocaproico [63], ADH [64], restos C_4 a C_{12} [65] etc. Como una alternativa al uso de un engarce, puede usarse un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguido de aminación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias bibliográficas 66 y 67.

Se prefiere un proceso que implique la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo sustitución de grupos =O terminales con $-\text{NH}_2$) seguido por derivatización con un diéster adípico (por ejemplo N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y reacción con la proteína de transporte.

En un procedimiento de conjugación preferido, un sacárido reacciona con la dihidracida del ácido adípico. Para el serogrupo A, en esta etapa también puede añadirse carbodiimida. Después de un periodo de reacción, se añade cianoborohidruro de sodio. Después, el sacárido derivatizado puede prepararse, por ejemplo, por ultrafiltración. Después el sacárido derivatizado se mezcla con una proteína de transporte (por ejemplo con una anatoxina diftérica), y se añade carbodiimida. Después de un periodo de reacción, el conjugado puede recuperarse. En la referencia bibliográfica 10 pueden encontrarse detalles adicionales de esta conjugación. Los conjugados que pueden obtenerse por este procedimiento son conjugados preferidos para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, conjugados que comprenden un vehículo de anatoxina diftérica y un engarce de ácido adípico.

Preferentemente, los conjugados se preparan por separado y después se mezclan. Después de mezclar, la concentración de los conjugados mezclados puede ajustarse, por ejemplo, con solución salina estéril tamponada con fosfato, sin pirógeno. Antes de mezclar, cada conjugado contiene preferentemente no más de 15 μg de vehículo.

El resultado de administrar conjugados meningocócicos de acuerdo con la invención es preferentemente que, para cada serogrupo administrado, el paciente provoca una respuesta de anticuerpos bactericidas séricos (ABS), siendo

el aumento de la titulación de ABS al menos de 4 veces (en comparación con el paciente pre-inmunizado antes de recibir los conjugados meningocócicos mezclados) y preferentemente al menos de 8 veces. El ensayo de ABS es un concepto correlativo convencional para la protección contra meningococos. En la referencia bibliográfica 68 se proporcionan detalles adicionales de conceptos correlativos serológicos para vacunas contra meningococos.

5 *Componentes antigénicos adicionales de las composiciones usadas de acuerdo con la invención*

Además de conjugados meningocócicos, las composiciones usadas de acuerdo con la invención pueden incluir opcionalmente 1, 2, ó 3 de los siguientes antígenos adicionales:

1. Un sacárido capsular conjugado de *S. pneumoniae* [por ejemplo, capítulo 23 de la referencia bibliográfica 32; referencias bibliográficas 69-71].

10 Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se usan mucho mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes como vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [72]. Por ejemplo, PrevNar™ [31] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) conjugándose cada sacárido individualmente con CRM197 por aminación reductora con 2 µg de cada sacárido por 0,5 ml de dosis (4 µg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos sobre un adyuvante de fosfato de aluminio. Cuando se incluyen conjugados neumocócicos en una composición para su uso con la presente invención, la composición incluye preferentemente al menos serotipos 6B, 14, 19F y 23F.

15 2. Un sacárido capsular conjugado de *H. influenzae* B [por ejemplo capítulo 14 de la referencia bibliográfica 32]. La proteína de transporte del conjugado puede ser CRM197, Da, una anatoxina tetánica o un complejo de membrana externa de *N. meningitidis*. El resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo polirribosilribitol fosfato (PRP) de longitud completa), pero se prefiere despolimerizar los polisacáridos capsulares para formar oligosacáridos (por ejemplo con un PM de ~1 a ~5 kDa). Un conjugado de Hib preferido comprende un oligosacárido unido covalentemente a CRM197 mediante un engarce de ácido adípico [73,74]. La administración del antígeno Hib preferentemente da como resultado una concentración de anticuerpo anti-PRP de >0,15 µg/ml y más preferentemente >1 µg/ml. Cuando una composición incluye un antígeno sacárido Hib, preferentemente tampoco incluye ningún adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio entonces el antígeno Hib puede adsorberse [75] o no [27] al adyuvante. La prevención de la adsorción puede conseguirse seleccionando el pH correcto durante la mezcla de antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto de carga cero apropiado y un orden de mezcla apropiado para los diversos antígenos diferentes en una composición [76].

30 3. Un antígeno de proteína de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B [por ejemplo referencia bibliográfica 77].

La composición puede comprender uno o más antígenos de estos adicionales.

Dichos antígenos pueden o no adsorberse a una sal de aluminio.

Si el conjugado meningocócico se administra en una serie de dosis entonces ninguna, alguna o todas las dosis pueden incluir estos antígenos extra.

35 Preferentemente las composiciones que contienen los conjugados meningocócicos no incluyen la anatoxina tetánica. Preferentemente estas no incluyen antígenos contra tos ferina. Preferentemente estas no incluyen antígenos de superficie del virus de la hepatitis B. Preferentemente estas no incluyen poliovirus. Una composición contiene preferentemente no más de 50 µg de anatoxina diftérica por conjugado meningocócico y más preferentemente no más de 50 µg de anatoxina diftérica para todos los conjugados meningocócicos recombinados.

40 *La composición de vacuna*

La composición usada de acuerdo con la presente invención incluirá típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos dañinos al individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos por un experto habitual en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden existir sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Un vehículo típico es solución salina fisiológica estéril tamponada con fosfato sin pirógeno. En la referencia bibliográfica 78 puede encontrarse un análisis detallado sobre vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones usadas de acuerdo con la presente invención pueden incluir un agente antimicrobiano, particularmente si se envasan en un formato de dosis múltiple.

55 Las composiciones usadas de acuerdo con la presente invención pueden comprender detergentes, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes a bajos niveles por ejemplo <0,01%.

Las composiciones usadas de acuerdo con la presente invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro de sodio y/o fosfato de sodio). Estas pueden usarse para tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl, por ejemplo, aproximadamente de 8,8 mg/ml. Es típica una concentración de 1,2 mg/ml de fosfato de sodio.

5 Las composiciones usadas de acuerdo con la invención generalmente incluirán un tampón, por ejemplo, un tampón fosfato.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo manitol) o un disacárido (por ejemplo sacarosa o trehalosa) por ejemplo a aproximadamente 15-30 mg/ml (por ejemplo 25 mg/ml), particularmente si tienen que liofilizarse o si incluyen material que se ha reconstituido de material liofilizado. Sin embargo, las composiciones preferidas no están liofilizadas, es decir, todos los conjugados meningo-cócicos están presentes en forma acuosa, desde la etapa de envasado hasta la etapa de administración.

10 Generalmente las composiciones se administrarán directamente al paciente. La administración directa puede conseguirse por inyección parenteral (por ejemplo por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra administración mucosa. Se prefiere la administración intramuscular (por ejemplo en el muslo o el brazo). La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo una aguja hipodérmica), pero como alternativa también puede usarse una inyección sin aguja. Una dosis típica intramuscular es de 0,5 ml.

Los conjugados meningo-cócicos de serogrupos múltiples se administran en mezcla con una sola composición. La composición puede administrarse como una monodosis o puede administrarse más de una vez en un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede continuar con un programa de dosis de refuerzo de conjugados meningo-cócicos. La temporización adecuada entre dosis de sensibilización (por ejemplo entre 4-16 semanas) y entre la sensibilización y el refuerzo, puede determinarse de manera rutinaria. Los conjugados pueden administrarse convenientemente al mismo tiempo como otras vacunas, por ejemplo, al mismo tiempo como una vacuna contra D-T-T o al mismo tiempo como una vacuna neumocócica conjugada o al mismo tiempo como una vacuna contra la gripe o al mismo tiempo como una vacuna contra MMR o MMRV. Generalmente estas vacunas se administrarán por separado pero durante la misma consulta médica.

Las infecciones bacterianas pueden afectar diversas áreas del cuerpo y por esto las composiciones pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como suspensiones o como soluciones líquidas. Antes de la inyección, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos (por ejemplo una composición liofilizada). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula o como un jarabe (opcionalmente con sabor). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizador. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, ótica u ocular por ejemplo como pulverizaciones, gotas, gel o polvo [por ejemplo, referencias bibliográficas 79 y 80]. Sin embargo, en general, los conjugados meningo-cócicos se formulan para inyección intramuscular.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención pueden o no incluir un adyuvante de vacuna. Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones adecuadas que contienen minerales para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia bibliográfica 81] o mezclas de diferentes compuestos minerales, adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo gel, cristalina, amorfa, etc.) y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [82].

Particularmente se prefieren los fosfatos de aluminio y un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluyendo aproximadamente 0,6 ml Al^{3+}/ml . Puede usarse una adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo entre 50 y 100 $\mu g Al^{3+}$ por conjugado por dosis. Cuando una composición incluye conjugados de especies bacterianas múltiples no todos los conjugados necesitan adsorberse

B. Emulsiones oleaginosas

55 Las composiciones de emulsiones oleaginosas adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [capítulo 10 de la referencia bibliográfica 81; véase también la referencia bibliográfica 83] (Escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 0,5%, formulado en partículas

submicrométricas usando un microfluidizador). También puede usarse adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF).

C. Formulaciones con saponina [capítulo 22 de la referencia bibliográfica 81]

5 Las formulaciones con saponina también pueden usarse como adyuvantes en la presente invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la madera, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia variedad de especies vegetales. La saponina de la madera del árbol *Quillaja saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse en el mercado procedente de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones con adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas tales como los ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

10 Las composiciones con saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Usando estas técnicas se han identificado fracciones purificadas específicas incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la ref. 84 se describe un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones con saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol [85].

15 Las combinaciones de saponinas y colesterol que pueden usarse para formar partículas únicas se denominan complejos inmunoestimuladores (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia bibliográfica 81]. Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido, tal como fosfatidil etanolamina o fosfatidil colina. En los ISCOM puede usarse cualquier saponina conocida. Preferentemente, los ISCOM incluyen uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las referencias bibliográficas 85-87. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergentes adicionales [88].

20 En las referencias bibliográficas 89 y 90 puede encontrarse una revisión sobre el desarrollo de adyuvantes basados en saponina.

D. Virosomas y partículas de tipo virus

25 Los virosomas y las partículas de tipo virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente son no-patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ningún genoma viral natural. Las proteínas virales pueden producirse de manera recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como Ha o NA), virus de la Hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o de la cápside), virus de la Hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, virus de la Enfermedad de Pie y Boca, Retrovirus, virus Norwalk, virus del Papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tales como proteínas de cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposon Ty). Las VLP se analizan adicionalmente en las referencias bibliográficas 91-96. Los virosomas se analizan adicionalmente, por ejemplo, en la referencia bibliográfica 97.

E. Derivados bacterianos o microbianos

35 Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos, tales como derivados no tóxicos del lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas de ADP ribosilantes y sus derivados destoxificados.

40 Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En la referencia bibliográfica 98 se describe una forma preferida de "partícula pequeña" de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para poder esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 μm [98]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato por ejemplo RC-529 [99,100].

45 Los derivados del lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las referencias bibliográficas 101 y 102.

50 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la presente invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida mediante un enlace fosfato a una guanina). También se ha demostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias bibliográficas 103, 104 y 105 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, la sustitución de guanina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se analiza más a fondo en las referencias bibliográficas 106-111.

La secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [112]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunológica Th1, tal como CpG-A ODN o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocito C, tal como CpG-B ODN. Los CpG-A y CpG-B ODN se analizan en las referencias bibliográficas 113-115. Preferentemente, el CpG es un CpG-A ODN.

- 5 Preferentemente el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, las referencias bibliográficas 112 y 116-118.

- Las toxinas ADP ribosilantes bacterianas y sus derivados destoxificados pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil "TL" de *E. coli*), cólera ("CT") o tosferina ("PT"). El uso de toxinas ADP ribosilantes destoxificadas como adyuvantes mucósicos se describe en la referencia bibliográfica 119 y como adyuvantes parenterales en la referencia bibliográfica 120. La toxina o anatoxina está preferentemente en forma de una holotoxina que comprende ambas subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante, preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de TL destoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP ribosilantes y sus derivados destoxificantes, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes pueden encontrarse en las referencias 121-128. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas ADP ribosilantes expuestas en la referencia bibliográfica 129.
- 10
15

F. Inmunomoduladores humanos

- 20 Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [130], etc.) [131], interferones (por ejemplo interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

- 25 En la invención también pueden usarse como adyuvantes bioadhesivos y mucoadhesivos. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [132] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados del poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y sus derivados también pueden usarse como adyuvantes en la invención [133].

H Micropartículas

- 30 En la invención también pueden usarse como adyuvantes micropartículas. Se prefieren micropartículas (es decir una partícula con un diámetro de ~100 nm a ~150 μ m, más preferentemente ~200 nm a ~30 μ m y más preferentemente con un diámetro de ~500 nm a ~10 μ m) formadas con materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo un poli(α -hidroxiácido), un poli(ácido hidroxibutírico), un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.) con poli(láctida-co-glicólico), opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo con un detergente catiónico tal como CTAB).

- 35 *I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la referencia bibliográfica 81)*

En las referencias bibliográficas 134-136 se describen ejemplos de formulaciones adecuadas con liposomas para su uso como adyuvantes.

J. Formulaciones de polioxietilen éter y polioxietilen éster

- 40 Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen polioxietilén éter y polioxietilén éster [137]. Dichas formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de polioxietilén sorbitan éster en combinación con un octoxinol [138] así como tensioactivos de polioxietilén alquil éter o éster en combinación con al menos otro tensioactivo no iónico tal como octoxinol [139]. Los polioxietilén éteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilén-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilén-9-esteoril éter, polioxietilén-8-esteoril éter, polioxietilén-4-lauril éter, polioxietilén-35-lauril éter y polioxietilén-23-lauril éter.

- 45 *L. Péptidos de muramilo*

Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi) etilamina MTP-PE).

K Polifosfaceno (PCPP)

- 50 Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las referencias bibliográficas 140 y 141

M. Compuestos de imidazoquinolona.

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo "Resiquimod 3M"), y se describen más a fondo en las referencias bibliográficas 142 y 143.

N. Compuestos de Tiosemicarbazona

- 5 En la referencia bibliográfica 144 se describen ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como procedimientos para formular, preparar y seleccionar compuestos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas tales como TNF- α .

O. Compuestos de triptantrina.

- 10 En la referencia bibliográfica 145 se describen ejemplos de compuestos de triptantrina así como procedimientos para preparar, formular y seleccionar compuestos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .

- 15 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, en la invención pueden usarse las siguientes composiciones de adyuvantes: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [146]; (2) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) [147]; una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [148], (5) combinaciones de 3dMPL, por ejemplo, con QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [149]; (6) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80™ al 0,4%, polímero en bloque plurónico L121 al 5% y thr-MDP, microfluidificado en una emulsión submicrónica o sometido a agitación vorticial para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula. (7) el sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (EPC), preferentemente MPL + EPC (Detox™); (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dMPL); y (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulador (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).
- 20
- 25

En el capítulo 7 de la referencia bibliográfica 81 se describen otras sustancias que actúan como agente inmunoestimuladores.

- 30 Se prefiere particularmente el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio y los conjugados se adsorben generalmente a estas sales [por ejemplo, los ejemplos 7 y 8 y de la referencia bibliográfica 9; el ejemplo J de la referencia bibliográfica 10]. También es posible la mezcla con sales de aluminio sin adsorción [27, 76]. Otro adyuvante preferido es el fosfato de calcio. Los conjugados pueden mezclarse con los adyuvantes (y opcionalmente adsorberse a ellos) por separado y después los conjugados pueden mezclarse entre sí o los conjugados pueden mezclarse entre sí y después mezclarse con el adyuvante.
- 35

El pH de las composiciones usadas de acuerdo con la invención es preferentemente entre 6 y 8, preferentemente de aproximadamente 7. Usando un tampón puede mantenerse estable el pH. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [150]. La composición puede ser estéril y/o sin pirógeno. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

- 40 Las composiciones pueden incluir un conservante (por ejemplo, tiomersal, 2-fenoxietanol) o pueden no incluir conservantes. Las composiciones preferidas de la invención no incluyen ningún material mercuríco por ejemplo no tienen tiomersal.

Para evitar interferencias entre antígenos, particularmente antígenos conjugados es posible incluir un polímero polianiónico, tal como poli(ácido-L-glutámico) [151].

- 45 Las composiciones pueden presentarse en viales o pueden presentarse en jeringas ya rellenas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una sola dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una sola dosis o dosis múltiples. Las composiciones inyectables normalmente serán soluciones o suspensiones líquidas. Como alternativa, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo liofilizada) para su solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

- 50 Las composiciones pueden envasarse en forma monodosis o en forma multidosis. Para las formas multidosis, se prefieren los viales a las jeringas ya rellenas. Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse rutinariamente, pero una dosis típica de la composición para seres humanos para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

- 55 Cuando una composición va a prepararse de modo improvisado antes del uso (por ejemplo cuando se presenta un componente en forma liofilizada) y está presente como un kit, el kit puede comprender dos viales o puede

comprender una jeringa ya rellena y un vial usándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos de los viales antes de la inyección. Para las composiciones que incluyen un sacárido capsular del serogrupo A el sacárido del serogrupo A puede estar liofilizado, mientras que el sacárido (o sacáridos) de otro serogrupo (o serogrupos) puede estar presente en forma líquida.

- 5 Las composiciones comprenderán una cantidad inmunológicamente eficaz de los conjugados meningocócicos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" significa que la administración de esa cantidad a un individuo, tanto en una dosis única o como parte de una serie, provoca una respuesta inmunitaria anti-meningocócica protectora en pacientes. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y del estado físico del individuo a tratar, de la edad, del grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación del doctor que trata la situación médica y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios y una cantidad típica de cada antígeno meningocócico por dosis es entre 1 µg y 20 µg por serogrupo (medida en términos de sacárido) por ejemplo entre 2 y 10 µg por serogrupo. Se prefiere una dosis de aproximadamente 4 µg por serogrupo (es decir un total de 16 µg en una mezcla tetravalente).

Preferentemente la cantidad total de proteína de transporte en una composición no es mayor de 100 µg/dosis por ejemplo es <90 µg/dosis, <80 µg/dosis, <70 µg/dosis, <60 µg/dosis, ≤50 µg/dosis, etc. La cantidad total de proteína de transporte en una composición será generalmente al menos 10 µg/dosis.

Generalidades

- 20 El término "comprende" incluye "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo un composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

El término "aproximadamente" con respecto a un valor numérico X significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

- 25 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que "sustancialmente carece" de Y puede carecer completamente de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

Ausencia de supresión por vehículo usando mezcla de conjugado tetravalente A/C/W135/Y

- 30 Las mezclas de conjugados meningocócicos para los serogrupos A+C, C+W+Y o A+C+W+Y pueden prepararse como se describe en las referencias bibliográficas 9 y 10. Si se desea, estas pueden mezclarse con adyuvantes de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio, como también se describe en las referencias bibliográficas 9 y 10. Estas vacunas tienen CRM197 o anatoxina diftérica (Da) como proteína de transporte, unida covalentemente a los sacáridos.

- 35 Se seleccionaron pacientes que recibieron vacunación pediátrica contra D-T-T (D-T-Pa o D-T-Pw) incluyendo los que recibieron vacunas que contenían D-T-T y otros antígenos (por ejemplo tetravalente D-T-T-Hib, tetravalente D-T-T-HBsAg, pentavalente D-T-T-Hib-HBsAg, hexavalente D-T-T-Hib-HBsAg-IPV, etc.) para recibir la mezcla de conjugados que tenía un vehículo de Da. Esta mezcla tetravalente de conjugados es inmunogénica en seres humanos [9, 11, 13].

- 40 Se seleccionaron pacientes que recibieron vacunación pediátrica contra Hib (bien como Hib monovalente, con o sin D-T-Pa o D-T-Pw o como parte de una vacuna de combinación tal como tetravalente D-T-T-Hib, pentavalente D-T-T-Hib-HBsAg, hexavalente D-T-T-Hib-HBsAg-IPV) para recibir la mezcla de conjugados que tenía un vehículo de CRM197.

Se seleccionó un grupo de pacientes de control para recibir una de las dos mezclas de conjugados. Los pacientes de control no habían recibido previamente ni anatoxina diftérica ni CRM197, ni como antígenos individuales ni como proteínas de transporte en conjugados.

- 45 Se evaluó la capacidad de los conjugados tetravalentes para provocar una respuesta inmunitaria en los pacientes. La supresión por vehículo se indica si los grupos de ensayo muestran respuestas inmunitarias antimeningocócicas significativamente inferiores a las de los pacientes de control y en particular si los conjugados no provocan una respuesta de ABS útil en pacientes.

- 50 En el ensayo clínico V52P2, realizado en Finlandia y Alemania con 620 sujetos de 12-16 meses de edad, se ensayaron cinco formulaciones. Las vacunas usaron vehículo CRM197 y un adyuvante de fosfato de aluminio [10]. Las dosis de cada serogrupo de sacárido, expresadas como µg de masa de sacárido por 0,5 ml de dosis, fueron las siguientes:

Grupo	MenA	MenC	MenW135	MenY
1	10	10	10	10
2	0	10	10	10
3	10	5	5	5
4	5	5	5	5
5	2,5	2,5	2,5	2,5

Los sujetos recibieron una inyección en el momento cero, y después el 25% de los sujetos recibió una segunda dosis de la vacuna 4 semanas más tarde.

5 Los sueros de los pacientes se recogieron 1 mes después de la administración de la vacuna y se ensayaron en un ensayo de ABS frente a *N. meningitidis* para cada serogrupo usando complemento humano. Se evaluó el aumento de la titulación de ABS con respecto al suero en tiempo cero siendo los criterios $\geq 1:4$ y $\geq 1:8$, las titulaciones (MGT) anti-cápsula también se midieron para cada serogrupo. En la siguiente Tabla 1 se muestran los resultados.

10 Por lo tanto las vacunas trivalentes como las y tetravalentes eran inmunogénicas en niños pequeños. Los conjugados son inmunogénicos a dosis de sacáridos tan bajas como 2,5 μg por conjugado. La respuesta inmunitaria es reforzable, con grandes aumentos de la titulación de ABS después de la segunda dosis. En este ensayo no se observó ninguna prueba de supresión por vehículo.

Carencia de supresión de respuestas anti-Da

15 Un estudio realizado en Bélgica el año 1999 [26] demostró en recién nacidos inmunidad modificada contra el tétanos, que persistía en infancia temprana, después de recibir un tratamiento primario de vacuna contra Hib conjugada con anatoxina tetánica. Por lo tanto, la proteína de transporte del conjugado tenía un impacto inmunológico negativo. Por otro lado, se observó el efecto opuesto en un estudio de vacunas conjugadas neumocócicas [152]. La posibilidad de que un conjugado meningocócico pudiera interferir con la inmunidad contra la difteria [153] se estudió usando un conjugado de sacárido meningocócico de serogrupo C con un vehículo CRM197 (Menjugate™).

20 Los niños se dividieron en cinco grupos, lo cuales se inmunizaron durante el primer año de vida de la siguiente manera: (1) cuatro dosis de Menjugate™; (2) tres dosis de Menjugate™ más una dosis de una mezcla A/C no conjugada bivalente; (3) tres dosis de vacuna contra HBsAg después una dosis de Menjugate™; (4) tres dosis de vacuna contra HBsAg después una dosis de una mezcla A/C no conjugada bivalente; (5) controles que no recibieron vacunas meningocócicas. Todos los niños también recibieron tres dosis de vacuna contra la difteria durante los
25 primeros cuatro meses de vida, pero no recibieron ningún refuerzo preescolar contra la difteria.

Los pacientes recibieron una sola dosis de Mejugate™ a los 4 años de edad y se realizó un muestreo de sangre previo- y posterior- (-30 días) a esta inyección de Mejugate™. Los anticuerpos contra difteria se midieron por ELISA y se evaluaron las concentraciones medias geométricas. También se evaluó el porcentaje de sujetos con un nivel de anticuerpo $\geq 0,1$ UI/ml. Los resultados fueron los siguientes:

Grupo	Prevacunación		Postvacunación	
	GMC	% $\geq 0,1$	GMC	% $\geq 0,1$
1	0,35	94%	9,00	100%
2	0,18	87%	8,55	100%
3	0,20	81%	2,82	100%
4	0,10	51%	4,55	99%

30 Las titulaciones anti-Da basales eran superiores en pacientes que previamente habían recibido Menjugate™ en comparación con aquellos que no lo habían recibido (comparense, por ejemplo, los grupos 1 y 4). Un análisis de regresión simple reveló relaciones lineales significativas entre el número de dosis de Menjugate™ previas (4, 3, 1 y 0 para los grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente) y (a) titulaciones de anti-Da antes de la vacunación y (b) titulaciones
35 anti-Da después de la vacunación.

5 Por lo tanto existe persistencia de inmunidad potenciada contra la difteria a los 4 años de edad en niños que recibieron cuatro dosis de Mejugate™ en la infancia. Además, existe una tendencia hacia mayores respuestas de anticuerpos anti-Da después de una dosis de refuerzo de Menjugate™ en pacientes que habían recibido al menos tres dosis de Menjugate™ siendo niños. No se encontraron pruebas de interferencia inmunológica entre conjugados meningocócicos y difteria.

La mezcla de conjugado A/C bivalente no muestra interferencias con DTT

10 En Nigeria [154] se administró una mezcla de sacáridos capsulares de los serogrupos A y C [8] a recién nacidos (de 5 a 11 semanas de edad) que no habían recibido previamente la vacuna contra DTT. Los niños recibieron sacáridos no conjugados (50 µg de cada serogrupo) o sacáridos conjugados con Da-sin adyuvante (4 µg de cada uno), con seis programas diferentes:

- (1) Cuatro dosis de conjugado: 6 semanas, 10 semanas, 14 semanas, 9 meses.
- (2) Tres dosis de conjugado: 6 semanas, 10 semanas, 14 semanas.
- (3) Dos dosis de conjugado: 14 semanas, 9 meses.
- (4) Una dosis de conjugado: 14 semanas.
- 15 (5) Una dosis de conjugado: 9 meses.
- (6) Una dosis no conjugada: 9 meses.

Los niños recibieron vacunas orales contra DTT y contra la polio a las 6, 10 y 14 semanas, con un refuerzo a los 9 meses y las vacunas meningocócicas se administraron al mismo tiempo que estas vacunas existentes. Para evaluar las respuestas anamnésicas, a los niños también se les proporcionó una vacuna no conjugada a los 24 meses.

20 Las respuestas de anticuerpos bactericidas séricos se midieron a las 18 semanas (es decir 4 semanas después de la tercera vacunación contra DTT/polio) a los 10 meses (es decir 1 mes después del refuerzo contra DTT/polio a los 9 meses) y 1 semana después de la administración de material no conjugado a los 24 meses. Los porcentajes de los pacientes que mostraron un aumento ≥ a 128 veces en titulaciones de ABS fueron los siguientes:

%	18 semanas		10 meses		24 ¹ / ₄	
	MenA	MenC	MenA	MenC	MenA	MenC
(1)	56	84	89	73	100	95
(2)	56	86	6	9	96	82
(3)	68	64	85	85	100	95
(4)	61	57	4	8	100	93
(5)	3	7	62	26	100	99
(6)	2	2	5	11	97	52

25 Entre los seis grupos no hubo diferencia en cuanto a las respuestas de los anticuerpos contra la anatoxina diftérica [8].

30 Por lo tanto no existen pruebas de interferencia resultante del uso de la anatoxina diftérica tanto como antígeno protector así como transportador para los conjugados. Por ejemplo, en el grupo 5 los pacientes habían recibido anatoxina diftérica en vacunas contra DTT a las 6, 10 y 14 semanas antes de recibir la primera dosis de conjugado meningocócico, pero mostraron una respuesta ABS anti-meningocócica de > 99% a los 24 meses.

Impacto no negativo sobre respuestas contra la difteria

35 Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes que reciben vacunas conjugadas meningocócicas al mismo tiempo que vacunas contra DTT no mostraron reducción en cuanto a respuestas inmunitarias contra la anatoxina diftérica. En otro estudio, los conjugados meningocócicos y DTT se habían administrado en diferentes tiempos. Se había seguido un programa de 3 dosis contra DTT a los 2, 3 y 4 meses de edad con una sola dosis de una vacuna A/C bivalente con sacáridos conjugados a Da o con sacáridos no conjugados. Las respuestas inmunitarias contra la anatoxina diftérica se midieron por ELISA y las MG (medias geométricas) de los títulos fueron las siguientes:

Antígenos	Pre-inmunización	Post-inmunización
Conjugados	0,05	21,2
No conjugados	0,06	0,06

5 Los sacáridos no conjugados no produjeron ninguna respuesta anti-Da (como cabría esperar), sin embargo los sacáridos conjugados dieron como resultado una fuerte respuesta anti-Da. La administración de estos conjugados puede por tanto proporcionar inmunidad contra la difteria en pacientes no tratados o puede tomar el lugar de un refuerzo contra Da.

Se entenderá que la invención anterior se describe sólo a modo de ejemplo y que pueden realizarse modificaciones permaneciendo al mismo tiempo dentro del alcance de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas.

TABLA 1 - Resultados del ensayo V59P2

Grupo	A	C	W135	Y
MGT (1 mes después de 1 dosis)				
1	3,9	6,4	7,1	8,9
2	2	6,1	8,3	8,5
3	5,7	5,2	6,9	12
4	3,8	4,5	7,0	9,6
5	3,9	5,3	7,0	12
MGT (1 mes después de 2 dosis)				
Grupo	A	C	W135	Y
1	27	89	22	37
2	2	80	20	57
3	29	76	28	58
4	14	47	20	35
5	17	71	23	52
% de pacientes con ABS > 1:4 (1 mes después de 1 dosis)				
1	33	56	57	58
2	0	57	60	61
3	55	49	53	70
4	37	42	54	64
5	40	51	57	67
% de pacientes con ABS ≥ 1:4 (1 mes después de 2 dosis)				
1	100	100	96	96
2	0	100	73	92
3	91	96	95	95
4	84	96	88	96

5	80	100	80	92
	% de pacientes con ABS \geq 1:8 (1 mes después de 1 dosis)			
1	25	44	46	48
2	0	40	50	49
3	39	34	45	64
4	23	30	44	51
5	26	35	40	60
	% de pacientes con ABS \geq 1:8 (1 mes después de 2 dosis)			
1	92	100	85	93
2	0	100	64	92
3	87	96	95	82
4	60	92	77	92
5	72	92	72	88

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS (los contenidos de las mismas se incorporan por referencia en el presente documento)

- 5 [1] Armand y col. (1982) J. Biol. Stand. 10: 335-339.
 [2] Cadoz y col. (1985) Vaccine 3: 340-342.
 [3] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
 [4] Baklaic y col. (1983) Infect. Immun. 42: 599-604.
 [5] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2: 47-49.
 [6] Costantino y col. (1992) Vaccine 10:6 91-8.
- 10 [7] Lieberman y col. (1996) JAMA 275: 1499-503.
 [8] Documento WO2005/000345.
 [9] Documento WO02/058737.
 [10] Documento WO03/007985.
 [11] Rennels y col. (2002) Pediatr Infect Dis J 21: 978-979.
- 15 [12] Documento WO2004/013400.
 [13] Campbell y col. (2002) J Infect Dis 186: 1848-1851.
 [14] Herzenberg y col. (1980) Nature 285: 664-667.
 [15] Schutze y col. (1985) J Immunol 135: 2319-2322.
 [16] Dagan y col. (1998) Infect Immun 66: 2093-2098.
- 20 [17] Barington y col. (1994) Infect Immun 62: 9-14.
 [18] Di John y col. (1989) Lancet 2(8677):1415-8.
 [19] Granoff y col. (1993) Vaccine Suppl1: S46-51.
 [20] Granoff y col. (1994) JAMA 272:1 116-1121.
 [21] Barington y col. (1993) Infect Immun 61: 432-438.
- 25 [22] Patente australiana 748716 (otorgada del documento WO98/51339).
 [23] Olander y col. (2001) Vaccine 20: 336-341.
 [24] Burrage y col. (2002) Infect Immun 70: 4946-4954.
 [25] Peeters y col. (1999) Infect Immun 59:3504-3510.
 [26] Hoppenbrouwers y col. (1999) Vaccine 17: 2588-98.
- 30 [27] Documento WO02/00249.
 [28] Documento WO00/56360.
 [29] Reddin y col. (2001) FEMS Immunol Med Microbiol 31: 153-162.
 [30] Podda y col. (1991) Vaccine 9: 741-745.
 [31] Darkes & Plosker (2002) Paediatr Drugs 4: 609-630.
- 35 [32] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
 [33] Del Giudice y col. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19: 1-70.
 [34] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.
 [35] Anderson (1983) Infect Immun 39(1): 233-238.
- 40 [36] Anderson y col. (1985) J Clin Invest 76(1): 52-59.
 [37] Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):1 95-196.

- [38] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2: S28-36.
 [39] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34: 163-168.
 [40] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 113-33, vii.
 [41] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47: 563-567.
 5 [42] Patente Europea 0477508.
 [43] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
 [44] Documento WO98/42721.
 [45] Dick y col. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10: 48-114.
 [46] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
 10 [47] Documento WO03/080678.
 [48] Glode y col. (1979) *J Infect Dis* 139: 52-56
 [49] Documento WO94/05325; Patente de Estados Unidos 5.425.946.
 [50] Solicitud de patente del Reino Unido 0323103.2.
 [51] Documento WO99/42130
 15 [52] Documento WO96/40242
 [53] Lees y col. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
 [54] Documento WO95/08348.
 [55] Patente de Estados Unidos 4.882.317
 [56] Patente de Estados Unidos 4.695.624
 20 [57] Porro y col. (1985) *Mol Immunol* 22: 907-919.
 [58] Documento EP-A-0208375
 [59] Documento WO00/10599
 [60] Gever et al. *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
 [61] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
 25 [62] Patente de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 [63] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
 [64] Patente de Estados Unidos 4.965.338
 [65] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
 [66] Patente de Estados Unidos 4.761.283
 30 [67] Patente de Estados Unidos 4.356.170
 [68] Balmer & Borrow (2004) *Expert Rev Vaccines* 3: 77-87.
 [69] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
 [70] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285, v.
 [71] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
 35 [72] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68: 1435-1440.
 [73] Kanra y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42: 421-427.
 [74] Ravenscroft y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47.
 [75] Documento WO97/00697.
 [76] Documento WO96/37222; Patente de Estados Unidos 6.333.036.
 40 [77] Documento WO2004/032958
 [78] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th ed. ISBN: 0683306472.
 [79] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3: 455-467.
 [80] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
 [81] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 45 [82] Documento WO00/23105.
 [83] Documento WO90/14837.
 [84] Patente de Estados Unidos 5.057.540.
 [85] Documento WO96/33739.
 [86] Documento EP-A-0109942.
 50 [87] Documento WO96/11711.
 [88] Documento WO00/07621.
 [89] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 247-271.
 [90] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 321-338.
 [91] Niikura y col. (2002) *Virology* 293: 273-280.
 55 [92] Lenz y col. (2001) *J Immunol* 166: 5346-5355.
 [93] Pinto y col. (2003) *J Infect Dis* 188: 327-338.
 [94] Gerber y col. (2001) *Virology* 75: 4752-4760.
 [95] Documento WO03/024480
 [96] Documento WO03/024481
 60 [97] Gluck y col. (2002) *Vaccine* 20: B10-B16.
 [98] Documento EP-A-0689454.
 [99] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278.
 [100] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 219-229.
 [101] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21: 2485-2491.
 65 [102] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21: 836-842.
 [103] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31: 2393-2400.

- [104] Documento WO02/26757.
 [105] Documento WO99/62923.
 [106] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9: 831-835.
 [107] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185.
 5 [108] Documento WO98/40100.
 [109] Patente de Estados Unidos 6.207.646.
 [110] Patente de Estados Unidos 6.239.116.
 [111] Patente de Estados Unidos 6.429.199.
 [112] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3): 654-658.
 10 [113] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170: 4061-4068.
 [114] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23: 64-65.
 [115] Documento WO01/95935.
 [116] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306: 948-953.
 [117] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300: 853-861.
 15 [118] Documento WO03/035836.
 [119] Documento WO95/17211.
 [120] Documento WO98/42375.
 [121] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70: 3012-3019.
 [122] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19: 2534-2541.
 20 [123] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290: 455-461.
 [124] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68: 5306-5313.
 [125] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67: 6270-6280.
 [126] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67: 209-216.
 [127] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 285-293.
 25 [128] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85:2 63-270.
 [129] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol* 15:1 165-1167.
 [130] Documento WO99/40936.
 [131] Documento WO99/44636.
 [132] Singh y col] (2001) *J Cont Release* 70: 267-276.
 30 [133] Documento WO99/27960.
 [134] Patente de Estados Unidos 6.090.406
 [135] Patente de Estados Unidos 5.916.588
 [136] Documento EP-A-0626169.
 [137] Documento WO99/52549.
 35 [138] Documento WO01/21207.
 [139] Documento WO01/21152.
 [140] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19: 109-115.
 [141] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31: 185-196.
 [142] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27: 571-577.
 40 [143] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4: 214-218.
 [144] Documento WO04/60308
 [145] Documento WO04/64759.
 [146] Documento WO99/11241.
 [147] Documento WO94/00153.
 45 [148] Documento WO98/57659.
 [149] Solicitud de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.
 [150] Documento WO03/009869.
 [151] Documento WO2004/110480.
 [152] Olander y col. (2002) *Vaccine* 20: 336-41.
 50 [153] Mc Vernon y col. (2003) *Vaccine* 21: 2573-9.
 [154] Chippaux y col. (2004) *Vaccine* 22: 3303-11.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende: (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N Meningitidis* del serogrupo A y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N Meningitidis* del serogrupo C y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (c) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N Meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica; y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N Meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica, para su uso en un procedimiento para inmunizar a un paciente humano contra una enfermedad ocasionada por *Neisseria meningitidis*, que comprende la etapa de administrar la composición al paciente humano, en el que el paciente se ha preinmunizado con (a) una anatoxina diftérica o derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende: (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una anatoxina diftérica; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una anatoxina diftérica; (c) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una anatoxina diftérica; y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una anatoxina diftérica, y en el que el paciente se ha preinmunizado con (a) una anatoxina diftérica y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) una anatoxina diftérica o CRM197.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende: (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) CRM197; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) CRM197; (c) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) CRM197; y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) de CRM197, y en el que el paciente se ha preinmunizado con un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) CRM197 o una anatoxina diftérica.
4. El uso de (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) de una anatoxina diftérica o un derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica; (c) de un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una anatoxina diftérica o un derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica, en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente humano contra una enfermedad ocasionada por *N. meningitidis*, en el que el paciente se ha preinmunizado con (a) una anatoxina diftérica o derivado de la misma que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica y/o (b) un conjugado (i) de un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) una anatoxina diftérica o derivado de la misma, que permanece inmunológicamente reactiva de manera cruzada con la anatoxina diftérica.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el uso es de: (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una anatoxina diftérica; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una anatoxina diftérica; (c) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una anatoxina diftérica; y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una anatoxina diftérica, y en el que el paciente se ha preinmunizado con (a) una anatoxina diftérica y/o (b) un conjugado (i) de un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) una anatoxina diftérica o CRM197.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el uso es de: (a) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) CRM197; (b) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) CRM197; (c) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) CRM197; y (d) un conjugado (i) del sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) CRM197, y en el que el paciente se ha preinmunizado con un conjugado (i) de un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis* y (ii) CRM197 o una anatoxina diftérica.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que los conjugados se mezclan para dar una proporción de 1:1:1:1 o 2:1:1:1 (medida como masa del sacárido).

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que cada antígeno meningocócico por dosis está comprendido entre 2 y 10 µg por serogrupo (medido en términos de sacárido).
- 5 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 8, para el uso de esta reivindicación o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el paciente se ha preinmunizado con una vacuna que comprende una anatoxina diftérica.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 9 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el paciente se ha preinmunizado con una vacuna que comprende un conjugado de Hib.
- 10 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 10 para el uso de esta reivindicación o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que el paciente se ha preinmunizado con una vacuna que comprende al menos un conjugado neumocócico.
- 15 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 11 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en el que el paciente se ha preinmunizado al menos seis meses antes del procedimiento o uso.
13. La composición de la reivindicación 12 para el uso de la reivindicación 12, o el uso de la reivindicación 12, en el que el paciente se ha preinmunizado al menos 8 años antes del procedimiento o uso.
- 20 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 13 para el uso de esta reivindicación o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en el que la preinmunización se produce durante el año siguiente del nacimiento del paciente.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 14 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicación 4 a 14, en el que los sacáridos en los conjugados meningocócicos (a) a (d) se han despolimerizado de manera que son más cortos que los sacáridos capsulares naturales observados en un meningococo.
- 25 16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 15 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15, en el que los conjugados meningocócicos comprenden un vehículo de anatoxina diftérica y un engarzador de ácido adípico.
17. La composición de la reivindicación 16 para el uso de la reivindicación 16, o el uso de la reivindicación 16, que comprende no más de 60 µg de vehículo de anatoxina diftérica.
- 30 18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 17 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 17, en el que la composición o el medicamento comprende adicionalmente un sacárido capsular conjugado de *Streptococcus pneumoniae*.
- 35 19. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 18 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 18, en el que la composición o el medicamento comprende adicionalmente un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo B.
20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 19 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 19, en el que la composición o el medicamento comprende adicionalmente un antígeno proteico del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.
- 40 21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 20 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que la composición o el medicamento comprende un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o un adyuvante de fosfato de aluminio.
22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 21 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 21, en el que la enfermedad ocasionada por *Neisseria meningitidis* meningitis meningocócica.
- 45 23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso de esta reivindicación, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que:
- el paciente se ha preinmunizado, al menos cinco años antes del procedimiento o uso, con una vacuna que comprende una anatoxina diftérica;
 - los conjugados meningocócicos comprenden un vehículo de anatoxina diftérica y opcionalmente, un
- 50 engarzador de ácido adípico;
- los conjugados meningocócicos están presentes a razón de 8 µg/ml (medidos como sacárido meningocócico) por serogrupo;
 - la proporción en peso de sacárido:vehículo para cada conjugado es de 1:3;

- la composición o medicamento incluye 96 µg/ml de anatoxina diftérica;
- la composición o medicamento incluye 1,2 mg/ml de fosfato de sodio; y
- la composición o medicamento incluye 8,8 mg/ml de cloruro de sodio.