

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 604**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06830743 .8**  
96 Fecha de presentación: **20.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1962899**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **VACUNA DE CONJUGADO DE POLISACÁRIDOS DE NEUMOCOCOS.**

30 Prioridad:  
22.12.2005 GB 0526232 07.04.2006 GB 0607087  
07.04.2006 GB 0607088 18.05.2006 GB 0609902  
12.10.2006 GB 0620336 12.10.2006 GB 0620337  
19.10.2006 GB 0620815 19.10.2006 GB 0620816  
12.12.2006 WO PCT/GB2006/004634

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.12.2011**

73 Titular/es:  
**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**  
**RUE DE L'INSTITUT, 89**  
**1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:  
**BIEMANS, Ralph Leon;**  
**GARCON, Nathalie Marie-Josephe;**  
**HERMAND, Philippe Vincent;**  
**POOLMAN, Jan y**  
**VAN MECHELEN, Marcelle Paulette**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 604 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

Vacuna de conjugado de polisacáridos de neumococos

**Antecedentes de la invención**

- 5 Los niños de menos de 2 años de edad no montan respuestas inmunes contra la mayoría de las vacunas de polisacáridos, de modo que ha sido necesario volver a los polisacáridos inmunogénicos por conjugación química con un vehículo proteico. El acoplamiento del polisacárido, un antígeno T-independiente, a una proteína, un antígeno T-dependiente, confiere al polisacárido las propiedades de T dependencia incluyendo el cambio de isotipo, la maduración de afinidad, y la inducción de memoria. El documento WO03/051392 describe la formulación de vacunas de conjugado de *Streptococcus pneumoniae* de serotipo múltiple.
- 10 Sin embargo, puede haber problemas con la administración repetida de conjugados polisacárido-proteína, o la combinación de conjugados polisacárido-proteína para formar vacunas multivalentes. Por ejemplo, se ha informado de que se ensayó una vacuna del polisacárido tipo b de *Haemophilus influenzae* (PRP) usando toxoide tetánico (TT) como vehículo proteico en un intervalo de dosificación con inmunización simultánea con TT (libre) y una vacuna de conjugado polisacárido de neumococos-TT siguiendo un programa convencional para bebés. Según se aumentaba
- 15 la dosificación de la vacuna para neumococos, se disminuía la respuesta inmune contra la parte del polisacárido PRP de la vacuna de conjugado Hib, lo que indica una interferencia inmune del polisacárido, posiblemente mediante el uso de la misma proteína vehículo (Dagan y col., Infect Immun. (1998); 66: 2093-2098)
- El efecto de la dosificación de la proteína vehículo sobre la respuesta humoral de la propia proteína también ha demostrado ser multifacético. En bebés humanos se ha informado de que el aumento de la dosificación de un
- 20 conjugado de toxoide tetánico tetravalente provocaba una respuesta disminuida contra el vehículo tetánico (Dagan y col. supra). El análisis clásico de estos efectos de vacunas de combinación se ha descrito como supresión epitópica inducida por vehículo, que no se comprende completamente, pero se cree que es el resultado de una cantidad en exceso de la proteína vehículo (Fattom, Vaccine 17: 126 (1999)). Parece que esto provoca la competición por las células Th, mediante las células B para la proteína vehículo, y las células B para el polisacárido. Si predominan las
- 25 células B para la proteína vehículo, no hay suficientes células Th disponibles para proporcionar la ayuda necesaria para las células B específicas para el polisacárido. Sin embargo, los efectos inmunológicos observados han sido incongruentes, aumentando la cantidad total de la proteína vehículo en algunos casos la respuesta inmune, y disminuyendo en otros casos la respuesta inmune.
- Por tanto, sigue habiendo dificultades técnicas para combinar múltiples conjugados de polisacáridos en una única
- 30 formulación de vacuna eficaz.
- Streptococcus pneumoniae* es una bacteria gram-positiva responsable de una considerable morbilidad y mortalidad (particularmente en jóvenes y ancianos), que causa enfermedades invasivas tales como la neumonía, la bacteremia y la meningitis, y enfermedades asociadas con la colonización, tal como la otitis media aguda. La tasa de neumonía por neumococos en los Estados Unidos para personas de más de 60 años de edad se estima en 3 a 8 por 100.000.
- 35 En el 20% de los casos esto conduce a bacteremia, y otras manifestaciones tales como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana al 30% incluso con tratamiento antibiótico.
- Los neumococos se encapsulan con un polisacárido químicamente ligado que confiere especificidad de serotipo. Existen 90 serotipos conocidos de neumococos, y la cápsula es el determinante de virulencia principal para los
- 40 neumococos, ya que la cápsula no solamente protege la superficie interna de la bacteria del complemento, sino que es en sí misma poco inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos T-independientes, y no pueden procesarse o presentarse en moléculas MHC para interactuar con células T. Sin embargo, pueden estimular al sistema inmune a través de un mecanismo alternativo que implica entrecruzamiento de receptores superficiales en células B.
- Se ha demostrado en varios experimentos que la protección contra enfermedad por neumococos invasivos está
- 45 correlacionada muy fuertemente con anticuerpos específicos para la cápsula, y la protección es específica de serotipo.
- Streptococcus pneumoniae* es la causa más común de enfermedad bacteriana invasiva y otitis media en bebés y niños jóvenes. Asimismo, los ancianos montan malas respuestas contra vacunas para neumococos [Roghmann y col., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], por tanto la incidencia aumentada de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].
- 50 Los síndromes clínicos principales causados por *S. pneumoniae* están ampliamente reconocidos y analizados en todos los libros de texto médicos convencionales (Fedson DS, Muscher DM. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4ª edición. PhiladelphiaWB Saunders Co, 2004a: 529-588). Por ejemplo, la enfermedad invasiva por neumococos (IPD) se define como cualquier infección en la que se aísla *S. pneumoniae* de la sangre u otro sitio normalmente estéril (Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious diseases (5ª ed). Nueva York, Churchill Livingstone, 2001, p2128-2147). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se reconoce porque abarca varias afecciones (obstrucción de las vías
- 55 respiratorias, bronquitis crónica, bronquiolitis o enfermedad de las vías respiratorias pequeñas y enfisema) que a

menudo coexisten. Los pacientes sufren empeoramientos de su afección que están habitualmente asociados con dificultad aumentada para respirar, y a menudo tienen más toses que pueden ser productivas de moco o esputo purulento (Wilson, Eur Respir J 2001 17:995-1007). La EPOC se define fisiológicamente por la presencia de obstrucción irreversible o parcialmente reversible de las vías respiratorias en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov;152(5 Pt 2):S77-121). Los empeoramientos de la EPOC a menudo están causados por infección bacteriana (por ejemplo, neumococos) (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. 2001 Abr;14(2):336-63).

10 Por tanto un objeto de la presente invención es desarrollar una formulación mejorada de una vacuna de conjugado de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* de múltiple serotipo.

### **Breve descripción de las Figuras**

15 **Figura 1** Diagrama de barras que muestra la inmunogenicidad del conjugado 11 valente en monos Rhesus viejos. Las barras más claras representan la GMC después de dos inoculaciones con el conjugado 11 valente en adyuvante de fosfato de aluminio. Las barras más oscuras representan la GMC después de dos inoculaciones con conjugado 11 valente en adyuvante C.

**Figura 2** Diagrama de barras que muestra células B de memoria para PS3 después de inoculación con el conjugado 11 valente en adyuvante C o adyuvante de fosfato de aluminio.

20 **Figura 3** Diagrama de barras que muestra la inmunogenicidad anti-polisacárido 19F en ratones Balb/C para los polisacáridos sencillos 4-valentes y los conjugados dPly 4-valentes.

**Figura 4** Diagrama de barras que muestra la inmunogenicidad anti-polisacárido 22F en ratones Balb/C para los polisacáridos sencillos 4-valentes y los conjugados PhtD 4-valentes.

**Figura 5** Diagrama de barras que muestra la respuesta IgG anti-22F en ratones Balb/c.

**Figura 6** Diagrama de barras que muestra los títulos de opsonofagocitosis anti-22F en ratones Balb/c.

25 **Figura 7** Diagrama de barras que compara las respuestas IgG inducidas en ratones C57B1 jóvenes después de inmunización con la vacuna de conjugado 13 valente formulada en diferentes adyuvantes.

**Figura 8** Diagrama de barras que muestra la eficacia protectora de diferentes combinaciones de vacuna en un modelo de neumonía en monos.

30 **Figura 9** Diagrama de barras que muestra la respuesta IgG anti-PhtD en ratones Balb/c después de inmunización con conjugados 22F-PhtD o 22F-AH-PhtD.

**Figura 10** Protección contra estimulación por neumococos tipo 4 en ratones después de inmunización con 22F-PhtD o 22F-AH-PhtD.

### **Descripción de la invención**

35 La presente invención proporciona una vacuna mejorada contra *Streptococcus pneumoniae* que comprende 9 o más, o 10 o más (por ejemplo, 11, 12, 13, 14, o 15 o más) sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con 2 o más proteínas vehículo, en la que la composición comprende el sacárido capsular de serotipo 19F conjugado con el toxoide diftérico (DT), pero no comprende el sacárido capsular del serotipo 19A, para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.

40 Para los propósitos de esta invención, "inmunizar un huésped humano contra empeoramientos de EPOC" o "tratamiento o prevención de empeoramientos de EPOC" o "reducción en la gravedad de los empeoramientos de EPOC" se refieren a una reducción en la incidencia o tasa de empeoramientos de EPOC (por ejemplo, una reducción en la tasa del 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20% o más) o una reducción en la gravedad de los empeoramientos de EPOC como se ha definido anteriormente, por ejemplo dentro de un grupo de pacientes inmunizados con las composiciones o vacunas de la invención.

45 Típicamente, la vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá antígenos sacáridos capsulares (preferiblemente conjugados), en la que los sacáridos se obtienen de al menos diez serotipos de *S. pneumoniae*. La cantidad de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar de 10 serotipos diferentes (o "V", valencias) a 23 serotipos diferentes (23V). En una realización hay 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 serotipos diferentes. 50 En otra realización de la invención, la vacuna puede comprender sacáridos conjugados de *S. pneumoniae* y sacáridos no conjugados de *S. pneumoniae*. Preferiblemente, la cantidad total de serotipos de sacáridos es menor de o igual a 23. Por ejemplo, la invención puede comprender 10 serotipos conjugados y 13 sacáridos no conjugados. De un modo similar, la vacuna puede comprender 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 sacáridos conjugados y 12, 11, 10, 9, 8 ó

7, respectivamente, sacáridos no conjugados.

En una realización, la composición inmunogénica de *Streptococcus pneumoniae* multivalente de la invención se seleccionará entre los siguientes serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, aunque se aprecia que podría sustituirse uno o dos serotipos diferentes dependiendo de la edad del receptor que recibe la vacuna y la localización geográfica donde se administrará la vacuna, por ejemplo, el serotipo 6A puede incluirse en la lista. Por ejemplo, una vacuna 10-valente puede comprender polisacáridos de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una vacuna 11-valente también puede incluir sacáridos del serotipo 3. Una vacuna pediátrica (bebés) 12 ó 13-valente también puede incluir la formulación 10 u 11 valente suplementada con los serotipos 6A y 22F, o 6A y 15B, o 22F y 15B, mientras que una vacuna para ancianos 13-valente puede incluir la formulación 11 valente suplementada con los serotipos 8 y 12F, u 8 y 15B, u 8 y 22F, o 12F y 15B, o 12F y 22F, o 15B y 22F. Una vacuna pediátrica 14 valente puede incluir la formulación 10 valente descrita anteriormente suplementada con los serotipos 3, 6A, 8 y 22F; los serotipos 3, 6A, 12F y 22F; o los serotipos 3, 6A, 15B y 22F.

La composición, en una realización, incluye sacáridos capsulares obtenidos de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (preferiblemente conjugados). En una realización adicional de la invención se incluyen al menos 11 antígenos sacáridos (preferiblemente conjugados), por ejemplo, sacáridos capsulares obtenidos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización adicional de la invención, se incluyen al menos 12 ó 13 antígenos sacáridos, por ejemplo, una vacuna puede comprender sacáridos capsulares obtenidos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F o sacáridos capsulares obtenidos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 22F y 23F, aunque la descripción también contempla antígenos sacáridos adicionales, por ejemplo 23 valentes (tal como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

La vacuna de la presente invención puede comprender la proteína D (PD) de *Haemophilus influenzae* (véase, por ejemplo, el documento EP 0594610). *Haemophilus influenzae* es un organismo causante clave de la otitis media, y los presentes inventores han demostrado que incluyendo esta proteína en una vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* se proporcionará un nivel de protección contra la otitis media relacionada con *Haemophilus influenzae* (publicación POET de referencia). En una realización, la composición de vacuna comprende la proteína D. En un aspecto, la PD está presente como una proteína vehículo para uno o más de los sacáridos. En otro aspecto, la proteína D podría estar presente en la composición de vacuna como una proteína libre. En un aspecto adicional, la proteína D está presente tanto como una proteína vehículo como en forma de proteína libre. La proteína D puede usarse como una proteína de longitud completa o como un fragmento (documento WO0056360). En un aspecto adicional, la proteína D está presente como una proteína vehículo para la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los sacáridos pueden conjugarse con la proteína D. En este aspecto, la proteína D también puede estar presente como proteína libre.

La vacuna de la presente invención comprende dos o más tipos diferentes de proteína vehículo. Cada tipo de proteína vehículo puede actuar como vehículo para más de un sacárido, que pueden ser, los sacáridos, iguales o diferentes. Por ejemplo, los serotipos 3 y 4 pueden conjugarse con la misma proteína vehículo, a la misma molécula de proteína vehículo o a diferentes moléculas de la misma proteína vehículo. En una realización, pueden conjugarse dos o más sacáridos diferentes a la misma proteína vehículo, a la misma molécula de proteína vehículo o a diferentes moléculas de la misma proteína vehículo.

Cada sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* puede conjugarse a una proteína vehículo independientemente seleccionada entre el grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, PhtD, fusiones PhtDE (particularmente las descritas en el documento WO 01/98334 y el documento WO 03/54007), neumolisina destoxificada y proteína D, diferente del sacárido del serotipo 19F que siempre se conjuga a DT. A continuación se presenta una lista más completa de vehículos proteicos que pueden usarse en los conjugados de la invención.

Si el vehículo proteico es el mismo para 2 o más sacáridos de la composición, los sacáridos podrían conjugarse con la misma molécula del vehículo proteico (teniendo las moléculas vehículo 2 sacáridos más diferentes conjugados a la misma) [véase, por ejemplo, el documento WO 04/083251]. Como alternativa, los sacáridos pueden conjugarse cada uno por separado a diferentes moléculas del vehículo proteico (teniendo cada molécula de vehículo proteico solamente un tipo de sacárido conjugado con la misma).

La proteína vehículo conjugada a uno o más de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* en los conjugados presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención es opcionalmente un miembro de las proteínas de la familia de la triada de polihistidina (Pht), fragmentos o proteínas de fusión de las mismas. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparte un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con una secuencia descrita en el documento WO 00/37105 o el documento WO 00/39299 (por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos 1-838 ó 21-838 de la SEC ID N° 4 del documento WO 00/37105 para PhtD). Por ejemplo, las proteínas de fusión están compuestas por la longitud completa o fragmentos de 2, 3 ó 4 de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Son ejemplos de proteínas de fusión PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B y PhtE/D, donde las proteínas están ligadas con la primera mencionada en

el extremo N-terminal (véase, por ejemplo, el documento WO01/98334).

5 Cuando se usan fragmentos de proteínas Pht (por separado o como parte de una proteína de fusión), cada fragmento contiene opcionalmente uno o más motivos de la triada de histidina y/o regiones superenrolladas de dichos polipéptidos. Un motivo de la triada de histidina es la parte del polipéptido que tiene la secuencia HxxHxH donde H es histidina y x es un aminoácido diferente de histidina. Una región superenrollada es una región predicha por el algoritmo "Coils" Lupus, A y col. (1991) Science 252; 1162-1164. En una realización, el fragmento o cada fragmento incluye uno o más motivos de la triada de histidina así como al menos una región superenrollada. En una realización, el fragmento o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3, 4 ó 5 motivos de la triada de histidina (opcionalmente, con la secuencia Pht nativa entre las 2 o más triadas, o la secuencia intra-triada que es más del 50, 60, 70, 80, 90 ó 100% idéntica a la secuencia nativa de Pht intra-triada de neumococos - por ejemplo la secuencia intra-triada mostrada en la SEC ID N° 4 del documento WO 00/37105 para PhtD). En una realización, el fragmento o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3 ó 4 regiones superenrolladas. En una realización, una proteína Pht descrita en este documento incluye la proteína de longitud completa con la secuencia señal unida, la proteína madura de longitud completa con el péptido señal (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N-terminal) eliminado, variantes de origen natural de la proteína Pht y fragmentos inmunogénicos de la proteína Pht (por ejemplo, fragmentos como se han descrito anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos del documento WO00/37105 o el documento WO00/39299 donde dicho polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmune específica para dicha secuencia de aminoácidos del documento WO00/37105 o el documento WO00/39299).

20 En particular, el término "PhtD" como se usa en este documento incluye la proteína de longitud completa con la secuencia señal unida, la proteína madura de longitud completa con el péptido señal (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N-terminal) eliminado, variantes de origen natural de PhtD y fragmentos inmunogénicos de PhtD (por ejemplo, fragmentos como se han descrito anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 ó 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos de PhtD del documento WO00/37105 o el documento WO00/39299 donde dicho polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmune específica para dicha secuencia de aminoácidos de PhtD del documento WO00/37105 o el documento WO00/39299 (por ejemplo, la SEC ID N° 4 del documento WO 00/37105 para PhtD).

30 Si el vehículo proteico es el mismo para 2 o más sacáridos de la composición, los sacáridos podrían conjugarse a la misma molécula del vehículo proteico (teniendo las moléculas vehículo 2 sacáridos más diferentes conjugados a la misma) [véase, por ejemplo, el documento WO 04/083251]. Como alternativa, los sacáridos pueden conjugarse cada uno por separado a diferentes moléculas del vehículo proteico (teniendo cada molécula de vehículo proteico solamente un tipo de sacárido conjugado a la misma).

35 Son ejemplos de proteínas vehículo que pueden usarse en la presente invención DT (toxoides diftérico), TT (toxoides tetánico) o fragmento C de TT, DT CRM197 (un DT mutante) otros mutantes puntuales de DT, tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida y col. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; la delección o mutación de Glu-148 en Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 en Gly y otras mutaciones descritas en el documento US 4709017 o el documento US 4950740; la mutación de al menos uno o más restos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en el documento US 5917017 o el documento US 6455673; o el fragmento descrito en el documento US 5843711, neumolisina de neumococos (Kuo y col. (1995) Infect Immun 63; 2706-13) incluyendo ply destoxificada de algún modo, por ejemplo, dPLY-GMBS (documento WO 04081515, documento PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones PhtDE, fusiones PhtBE (documento WO 01/98334 y documento WO 03/54007), (a continuación se describen Pht A-E en más detalle) OMPC (proteína de membrana externa de meningococos - habitualmente extraída de *N. meningitidis* serogrupo B - documento EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae* - véase, por ejemplo, el documento EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas, péptidos sintéticos (documento EP0378881, documento EP0427347), proteínas de choque térmico (documento WO 93/17712, documento WO 94/03208), proteínas de pertussis (documento WO 98/58668, documento EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de células T humanas CD4+ de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) Infect Immun 72; 4884-7), la proteína superficial de neumococos PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761).

55 Nurkka y col. Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11):1008-14, 2004 Nov. describían una vacuna 11 valente contra neumococos con todos los serotipos conjugados a PD. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que la actividad opsonofagocítica se mejoraba para anticuerpos inducidos con conjugados que tienen 19F conjugado a DT en comparación con 19F conjugado a PD. Además, los presentes inventores han demostrado que se observa una reactividad cruzada mayor para 19A con 19F conjugado a DT. Por lo tanto, una característica de la composición de la presente invención es que el serotipo 19F se conjuga a DT. Los serotipos restantes de sacáridos de la composición inmunogénica pueden conjugarse todos a una o más proteínas vehículo que no son DT (es decir, solamente 19F se conjuga a DT), o pueden dividirse entre una o más proteínas vehículo que no son DT y

la propia DT. En una realización, 19F se conjuga a DT y todos los serotipos restantes se conjugan a PD. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT, y los serotipos restantes se dividen entre PD, y TT o DT o CRM 197. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT y no más de un sacárido se conjuga a TT. En un aspecto de esta realización, dicho un sacárido es 18C o 12F. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT y no más de dos sacáridos se conjugan a TT. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y DT o CRM 197. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y neumolisina. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y CRM 197. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT, neumolisina y opcionalmente PhtD o la proteína de fusión PhtD/E. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT, 19A se conjuga a neumolisina o TT, uno (dos o tres) sacárido(s) adicional(es) se conjuga(n) a TT, un sacárido adicional se conjuga a PhtD o PhtD/E y todos los sacáridos adicionales se conjugan a PD. En una realización adicional, 19F se conjuga a DT, 19A se conjuga a neumolisina, uno (dos o tres) sacárido(s) adicional(es) se conjuga(n) a TT, un sacárido adicional se conjuga a neumolisina, 2 sacáridos adicionales se conjugan a PhtD o PhtD/E y todos los sacáridos adicionales se conjugan a PD.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende proteína D de *Haemophilus influenzae*. Dentro de esta realización, si PD no es una de las proteínas vehículo usadas para conjugar algún sacárido diferente de 19F, por ejemplo, 19F se conjuga a DT mientras que los otros serotipos se conjugan a una o más proteínas vehículo diferentes que no son PD, entonces PD estará presente en la composición de vacuna como proteína libre. Si PD es una de las proteínas vehículo usadas para conjugar los sacáridos diferentes de 19F, entonces PD puede estar presente opcionalmente en la composición de vacuna como proteína libre.

El término "sacárido" en toda esta memoria descriptiva puede indicar polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan de bacterias y pueden ajustarse en tamaño a algún grado por procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, el documento EP497524 y el documento EP497525) y preferiblemente por microfluidización. Los polisacáridos pueden ajustarse en tamaño para reducir la viscosidad en muestras de polisacáridos y/o para mejorar la capacidad de filtración para productos conjugados. Los oligosacáridos tienen una baja cantidad de unidades de repetición (típicamente 5-30 unidades de repetición) y típicamente son polisacáridos hidrolizados.

Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden unidades de oligosacáridos repetitivas que pueden contener hasta 8 restos de azúcar. Para una revisión de las unidades de oligosacáridos para los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* clave véase JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Ciênc., Junio 2005, vol. 77, nº 2, p.293-324, ISSN 0001-3765. En una realización, un antígeno sacárido capsular puede ser un polisacárido de longitud completa, sin embargo, en otras, puede ser una unidad de oligosacárido, o más corta que la cadena de sacárido de longitud nativa de unidades de oligosacáridos repetitivas. En una realización, todos los sacáridos presentes en la vacuna son polisacáridos. Los polisacáridos de longitud completa pueden "ajustarse en tamaño", es decir, puede reducirse su tamaño por diversos procedimientos tales como tratamiento de hidrólisis ácida, tratamiento con peróxido de hidrógeno, ajuste de tamaño por emulsiflex® seguido de un tratamiento con peróxido de hidrógeno para generar fragmentos de oligosacáridos o microfluidización.

Los inventores también han advertido que el objetivo de la técnica ha sido usar oligosacáridos para facilitar la producción de conjugados. Los inventores han descubierto que usando conjugados de polisacáridos nativos o ligeramente ajustados en tamaño, pueden lograrse una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tiene alta inmunogenicidad que se puede filtrar, 2) la proporción de polisacárido a proteína en el conjugado puede alterarse de modo que la proporción de polisacárido a proteína (p/p) en el conjugado puede aumentarse (lo que puede tener un efecto sobre el efecto de supresión del vehículo), 3) pueden estabilizarse conjugados inmunogénicos propensos a hidrólisis por el uso de sacáridos más grandes para la conjugación. El uso de polisacáridos más grandes puede provocar el entrecruzamiento con el vehículo del conjugado y puede disminuir la liberación de sacárido libre desde el conjugado. Las vacunas de conjugado descritas en la técnica previa tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación para mejorar la conjugación. Los presentes inventores han descubierto que las vacunas de conjugados de sacáridos que retienen un tamaño más grande de sacárido pueden proporcionar una buena respuesta inmune contra enfermedad por neumococos.

La composición inmunogénica de la invención por tanto puede comprender uno o más conjugados de sacáridos donde el tamaño promedio (por ejemplo, el peso molecular promedio en peso;  $M_w$ ) de cada sacárido antes de la conjugación está por encima de 80 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa o 1000 kDa. En una realización, uno o más conjugados de sacáridos de la invención deben tener un tamaño promedio del sacárido antes de la conjugación de 50-1600, 80-1400, 100-1000, 150-500, o 200-400 kDa (obsérvese que cuando el tamaño promedio es  $M_w$ , las unidades de 'kDa' deben remplazarse en este documento por ' $\times 10^3$ '). En una realización, el conjugado después de la conjugación debe poderse filtrar fácilmente a través de un filtro de 0,2 micrómetros de modo que se obtenga un rendimiento de más del 50, 60, 70, 80, 90 o 95% después de la filtración en comparación con la muestra antes de la filtración.

Para los propósitos de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido que no se ha sometido a un procedimiento (por ejemplo, post-purificación), cuyo propósito es reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido puede llegar a reducirse ligeramente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. Dicho sacárido es

aún nativo. Solamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas de ajuste de tamaño el polisacárido no se consideraría nativo.

Para los propósitos de de la invención, "ajustado en tamaño en un factor de hasta x2" significa que el sacárido se somete a un procedimiento pretendido para reducir el tamaño del sacárido pero reteniendo un tamaño de más de la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X3, x4 etc. deben interpretarse del mismo modo, es decir, el sacárido se somete a un procedimiento pretendido para reducir el tamaño del polisacárido pero reteniendo un tamaño más de un tercio, un cuarto etc. del tamaño del polisacárido nativo. En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados a una proteína vehículo, donde al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados a una proteína vehículo, donde al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* está ajustado en tamaño por un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10. En una realización de este aspecto, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos se ajustan en tamaño por un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x 10.

El peso molecular o el peso (o tamaño) molecular promedio de un sacárido en este documento se refiere al peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) del sacárido medido antes de la conjugación y se mide por MALLS.

La técnica MALLS es bien conocida en la técnica y se realiza típicamente como se describe en el ejemplo 2. Para el análisis MALLS de sacáridos de neumococos, se pueden usar dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl) en combinación y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan usando un detector de dispersión de luz (por ejemplo Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo Wyatt Otilab DSP equipado con una célula P100 y un filtro de rojos a 498 nm).

En una realización, los sacáridos de *S. pneumoniae* son polisacáridos nativos o polisacáridos nativos que se han reducido en tamaño durante un procedimiento de extracción normal.

En una realización, los sacáridos de *S. pneumoniae* se ajustan en tamaño por escisión mecánica, por ejemplo, por microfluidización o sonicación. La microfluidización y la sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes suficientemente para proporcionar un conjugado que se pueda filtrar. El ajuste de tamaño es por un factor de no más de x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 o x2.

En una realización, la composición inmunogénica comprende conjugados de *S. pneumoniae* que se crean a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se han ajustado en tamaño por un factor de no más de x20. En un aspecto de esta realización, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos están ajustado en tamaño por un factor de hasta x2, x3, x4, x5 o x6.

En una realización, el sacárido de *Streptococcus pneumoniae* se conjuga a la proteína vehículo mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador bifuncional. El enlazador es opcionalmente heterobifuncional o homobifuncional, teniendo, por ejemplo, un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos ácido carboxílico reactivos. El enlazador tiene, por ejemplo, entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un enlazador posible es ADH. Otros enlazadores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever y col. (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), enlaces glicosídicos (documento US4673574, documento US4808700), hexanodiamina y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286). En una realización, se usa ADH como enlazador para conjugar el sacárido del serotipo 18C. En una realización, se usa ADH como enlazador para conjugar el sacárido del serotipo 22F.

Los conjugados de sacárido presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención pueden prepararse por cualquier técnica de acoplamiento conocida. El procedimiento de conjugación puede depender de la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado puede, de este modo, acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína vehículo. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que podría acoplarse al vehículo mediante un enlace tioéter obtenido después de la reacción con una proteína vehículo activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o proteína vehículo haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida [por ejemplo, etil yodoacetimida HCl] o N-succinimidil bromoacetato o SIAB, o SIA, o SBAP). Preferiblemente, el éster de cianato (opcionalmente creado por química de CDAP) se acopla con hexanodiamina o ADH y el sacárido amino-derivatizado se conjuga a la proteína vehículo usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el vehículo proteico. Dichos conjugados se describen en la solicitud PCT publicada WO 93/15760 Uniformed Services University y el documento WO 95/08348 y el documento WO 96/29094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchos se describen en el documento WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido

con CDI (Bethell y col. J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn y col. J. Chromatogr. 1981, 218; 509-18) seguido de la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Esto puede implicar la reducción del extremo anomérico en un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermedio CDI carbamato y el acoplamiento del intermedio CDI carbamato con un grupo amino en una proteína.

Los conjugados también pueden prepararse por procedimientos de aminación reductora directa como se describe en el documento US 4365170 (Jennings) y el documento US 4673574 (Anderson). Se describen otros procedimientos en el documento EP-0-161-188, el documento EP-208375 y el documento EP-0-477508.

Un procedimiento adicional implica el acoplamiento de un sacárido activado con bromuro de cianógeno (o CDAP) derivatizado con dihidrazida de ácido adípico (ADH) al vehículo proteico por condensación con carbodiimida (Chu C. y col. Infect. Immunity, 1983 245 256), por ejemplo usando EDAC.

En una realización, se une un grupo hidroxilo (preferiblemente un grupo hidroxilo activado, por ejemplo, un grupo hidroxilo activado para crear un éster de cianato [por ejemplo con CDAP]) en un sacárido a un grupo amino o carboxílico en una proteína directamente o indirectamente (a través de un enlazador). Cuando está presente un enlazador, preferiblemente se une un grupo hidroxilo en un sacárido a un grupo amino en un enlazador, por ejemplo usando conjugación con CDAP. Puede conjugarse un grupo amino adicional en el enlazador, por ejemplo, ADH, a un grupo ácido carboxílico en una proteína, por ejemplo, usando química de carbodiimida, por ejemplo, usando EDAC. En una realización, el o los sacáridos capsulares de neumococos se conjugan primero al enlazador antes de conjugarse en el enlazador a la proteína vehículo. Como alternativa, el enlazador puede conjugarse al vehículo antes de la conjugación al sacárido.

También puede usarse una combinación de técnicas, preparándose algunos conjugados sacárido-proteína por CDAP, y algunos por aminación reductora.

En general pueden usarse los siguientes tipos de grupos químicos en un vehículo proteico para el acoplamiento/conjugación:

A) Carboxilo (por ejemplo mediante ácido aspártico o ácido glutámico). En una realización este grupo se une a grupos amino en los sacáridos directamente o a un grupo amino en un enlazador con química de carbodiimida, por ejemplo, con EDAC.

B) Grupo amino (por ejemplo mediante lisina). En una realización este grupo se une a grupos carboxilo en los sacáridos directamente o a un grupo carboxilo en un enlazador con química de carbodiimida, por ejemplo, con EDAC. En otra realización este grupo se une a grupos hidroxilo activados con CDAP o CNBr en los sacáridos directamente o a dichos grupos en un enlazador; a sacáridos o enlazadores que tienen un grupo aldehído; a sacáridos o enlazadores que tienen un grupo éster de succinimida.

C) Sulfhidrilo (por ejemplo mediante cisteína). En una realización este grupo se une a un sacárido o enlazador acetilado con bromo o cloro con química de maleimida. En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

D) Grupo hidroxilo (por ejemplo mediante tirosina). En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

E) Grupo imidazolilo (por ejemplo mediante histidina). En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

F) Grupo guanidilo (por ejemplo mediante arginina).

G) Grupo indolilo (por ejemplo mediante triptófano).

En un sacárido, en general, pueden usarse los siguientes grupos para un acoplamiento: OH, COOH o NH<sub>2</sub>. Pueden generarse grupos aldehído después de diferentes tratamientos conocidos en la técnica tales como: peryodato, hidrólisis ácida, peróxido de hidrógeno, etc.

*Enfoques de acoplamiento directo:*

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH<sub>2</sub>-Prot --> conjugado Sacárido-aldehído + NH<sub>2</sub>-Prot --> base de Schiff + NaCNBH<sub>3</sub> --> conjugado Sacárido-COOH + NH<sub>2</sub>-Prot + EDAC --> conjugado Sacárido-NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC ---> conjugado

*Enfoque de acoplamiento indirecto mediante espaciador (enlazador):*

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> ---> sacárido--- NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC ---> conjugado



- Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH<sub>2</sub>---SH ---> sacárido--SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de modificación de los grupos amino de la proteína por SPDP por ejemplo) ---> sacárido-S-S-Prot
- 5 Sacárido-OH + CNBr o CDAP --> éster de cianato + NH<sub>2</sub>-SH ---> sacárido--SH + maleimida-Prot (modificación de los grupos amino) ---> conjugado
- Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH<sub>2</sub>--SH ---> sacárido-SH + Prot haloacetilada --> conjugado
- Sacárido-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>---NH<sub>2</sub> ---> sacárido---NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot ---> conjugado
- 10 Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub>--SH --> sacárido---SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de modificación de los grupos amino de la proteína por SPDP por ejemplo) --> sacárido-S-S-Proteína
- Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub>---SH ---> sacárido---SH + maleimida-Prot (modificación de los grupos amino) --> conjugado
- Sacárido-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>----SH --> sacárido-SH + Prot haloacetilada ---> conjugado
- Sacárido-aldehído + NH<sub>2</sub>----NH<sub>2</sub> ----> sacárido--NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado
- 15 Nota: en lugar de la EDAC anterior, puede usarse cualquier carbodiimida adecuada.
- En resumen, los tipos de grupo químico del vehículo proteico que pueden usarse generalmente para el acoplamiento con un sacárido son grupos amino (por ejemplo en resto de lisina), grupos COOH (por ejemplo en restos de ácido aspártico y ácido glutámico) y grupos SH (si están accesibles) (por ejemplo en resto de cisteína).
- 20 Preferiblemente, la proporción de proteína vehículo a sacárido de *S. pneumoniae* está entre 1:5 y 5:1; por ejemplo, entre 1: 0,5-4:1, 1:1-3,5:1, 1,2:1-3:1, 1,5:1-2,5:1; por ejemplo entre 1:2 y 2,5:1; 1:1 y 2:1 (p/p). En una realización, la mayoría de los conjugados, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los conjugados tienen una proporción de proteína vehículo a sacárido que es mayor de 1:1, por ejemplo 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1 o 1,6:1.
- 25 En una realización, al menos un sacárido de *S. pneumoniae* se conjuga a una proteína vehículo mediante un enlazador usando CDAP y EDAC. Por ejemplo, 18C o 22F puede conjugarse a una proteína mediante un enlazador (por ejemplo, aquellos con dos grupos hidrazino en sus extremos tal como ADH) usando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Cuando se usa un enlazador, puede usarse CDAP para conjugar el sacárido a un enlazador y después puede usarse EDAC para conjugar el enlazador a una proteína o, como alternativa puede usarse primero EDAC para conjugar el enlazador a la proteína, después de lo cual puede usarse CDAP para conjugar el enlazador al sacárido.
- 30 En general, la composición inmunogénica de la invención puede comprender una dosis de cada conjugado de sacárido entre 0,1 y 20 µg, 1 y 10 µg o 1 y 3 µg de sacárido.
- 35 En una realización, la composición inmunogénica de la invención contiene cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* a una dosis entre 0,1-20 µg; 0,5-10 µg; 0,5-5 µg o 1-3 µg de sacárido. En una realización, los sacáridos capsulares pueden estar presentes a diferentes dosificaciones, por ejemplo algunos sacáridos capsulares pueden estar presentes a una dosis de exactamente 1 µg o algunos sacáridos capsulares pueden estar presentes a una dosis de exactamente 3 µg. En una realización, los sacáridos de los serotipos 3, 18C y 19F (o 4, 18C y 19F) están presentes a una dosis mayor que otros sacáridos. En un aspecto de esta realización, los serotipos 3, 18C y 19F (o 4, 18C y 19F) están presentes a una dosis de aproximadamente o exactamente 3 µg mientras que otros sacáridos en la composición inmunogénica están presentes a una dosis de aproximadamente o exactamente 1 µg.
- 40 "Alrededor de" o "aproximadamente" se definen como dentro del 10% más o menos de la cantidad dada para los propósitos de la invención.
- 45 En una realización, al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* se conjuga directamente a una proteína vehículo (por ejemplo, usando una de las químicas descritas anteriormente). Preferiblemente, el al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* se conjuga directamente por CDAP. En una realización, la mayoría de los sacáridos capsulares, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o más se unen directamente a la proteína vehículo por CDAP (véase el documento WO 95/08348 y el documento WO 96/29094)
- 50 La composición inmunogénica puede comprender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*, en este documento llamadas proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas pueden usarse como proteínas vehículo, o pueden estar presentes como proteínas libres, o pueden estar presentes tanto como proteínas vehículo como en forma de proteínas libres. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención están expuestas en superficie, al menos durante parte del ciclo vital de los neumococos, o son proteínas que se secretan o liberan por los neumococos. Preferiblemente, las proteínas de la invención se seleccionan entre las siguientes categorías, tales

como proteínas que tienen un motivo de secuencia señal tipo II de LXXC (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia de la triada de polihistidina (PhtX)), proteínas de unión a colina (CbpX), proteínas que tienen un motivo de secuencia señal tipo I (por ejemplo, Sp101), proteínas que tienen un motivo LPXTG (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130), y toxinas (por ejemplo, Ply). Los ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas, o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos 1 proteína seleccionada entre el grupo que consiste en la familia de la triada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncamientos CbpX, la familia LytX, truncamientos LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) truncamiento CbpX-truncamiento LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. En una realización adicional, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en la familia de la triada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncamientos CbpX, la familia LytX, truncamientos LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) truncamiento CbpX-truncamiento LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, y Sp128. En una realización más, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en la familia de la triada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncamientos CbpX, la familia LytX, truncamientos LytX, proteínas de quiméricas (o fusiones) truncamiento CbpX-truncamiento LytX, neumolisina (Ply), y Sp128.

La familia Pht (triada de polihistidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias triadas de histidina, posiblemente implicadas en la unión a metales o nucleósidos o la actividad enzimática, (3-5) regiones superenrolladas, un extremo N-terminal conservado y un extremo C-terminal heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos ensayadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros estreptococos y *Neisseria*. En una realización de la invención, la proteína Pht de la invención es PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D, y E se refieren a proteínas que tienen secuencias descritas en las siguientes citas así como variantes de origen natural (y hechas por el hombre) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es al menos un 90% idéntica a las proteínas referenciadas. Preferiblemente, es al menos un 95% idéntica y mucho más preferiblemente es un 97% idéntica.

Con respecto a las proteínas PhtX, PhtA se describe en el documento WO 98/18930, y también se conoce como Sp36. Como se ha indicado anteriormente, es una proteína de la familia de la triada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II de LXXC. PhtD se describe en el documento WO 00/37105, y también se conoce como Sp036D. Como se ha indicado anteriormente, también es una proteína de la familia de la triada de polihistidina y tiene el motivo de señal LXXC tipo II. PhtB se describe en el documento WO 00/37105, y también se conoce como Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido de degradación de C3, como se describe en el documento WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia de la triada de polihistidina y tiene el motivo de señal LXXC tipo II. Un equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína Sp42 descrita en el documento WO 98/18930. Un truncamiento PhtB (de aproximadamente 79 kD) se describe en el documento WO99/15675 que también se considera un miembro de la familia PhtX. PhtE se describe en el documento WO00/30299 y se conoce como BVH-3. Cuando se hace referencia a cualquier proteína Pht en este documento, se entiende que pueden usarse fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos de la proteína Pht. Por ejemplo, una referencia a PhtX incluye fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos de cualquier proteína Pht. Una referencia a PhtD o PhtB también es una referencia a PhtDE o fusiones PhtBE como se encuentra, por ejemplo, en el documento WO0198334.

La neumolisina es una toxina multifuncional con actividades citolíticas distintivas (hemolíticas) y de activación del complemento (Rubins y col., *Am. Resp. Cit Care Med*, 153:1339-1346 (1996)). La toxina no se secreta por neumococos, sino que se libera después de la lisis de los neumococos bajo la influencia de la autolisina. Sus efectos incluyen, por ejemplo, la estimulación de la producción de citoquinas inflamatorias por monocitos humanos, la inhibición de la flagelación de los cilios en el epitelio respiratorio humano, y la disminución de la actividad bactericida y la migración de neutrófilos. El efecto más obvio de la neumolisina es en la lisis de glóbulos rojos, que implica la unión a colesterol. Como es una toxina, tiene que destoxicarse (es decir, hacerse en no tóxica para un ser humano cuando se proporcione a una dosificación adecuada para la protección) antes de que puede administrarse *in vivo*. La expresión y clonación de neumolisina de tipo silvestre o nativa es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y col. (*Infect Immun*, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell y col. (*Biochim Biophys Acta*, 1007:67-72 (1989) y Mitchell y col. (*NAR*, 18:4010 (1990)). La destoxicación de ply puede realizarse por medios químicos, por ejemplo, someterse a tratamiento con formalina o glutaraldeído o una combinación de ambos (documento WO04081515, documento PCT/EP2005/010258). Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica para diversas toxinas. Como alternativa, ply puede destoxicarse genéticamente. Por tanto, la invención abarca derivados de proteínas de neumococos que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutado" se usa en este documento para indicar una molécula que ha experimentado delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos usando técnicas bien conocidas para mutagénesis dirigida al sitio o cualquier otro procedimiento convencional. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, una proteína ply mutante puede alterarse de modo que sea biológicamente inactiva manteniendo al mismo tiempo sus epítopes inmunogénicos, véase, por ejemplo, el documento WO90/06951, Berry y col. (*Infect Immun*, 67:981-985 (1999)) y el documento WO99/03884.

Como se usa en este documento, se entiende que el término "Ply" se refiere a neumolisina mutada o destoxicada adecuada para uso médico (es decir, no tóxica).

Con referencia a la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), los miembros de esa familia se identificaron originalmente como proteínas de neumococos que podían purificarse por cromatografía de afinidad con colina. Todas las proteínas de unión a colina están unidas no covalentemente a restos de fosforilcolina del ácido teicoico de la pared celular y el ácido lipoteicoico asociado a membrana. Estructuralmente, tienen varias regiones en común en toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión a colina comprenden una región N-terminal (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión a colina conservada (C), compuesta de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se usa en esta solicitud, la expresión "familia de proteínas de unión a colina (CbpX)" se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas de unión a colina identificadas en el documento WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. CbpA se describe en el documento WO97/41151. CbpD y CbpG se describen en el documento WO00/29434. PspC se describe en el documento WO97/09994. PbcA se describe en el documento WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a colina descrita en el documento WO98/39450. Preferiblemente, las proteínas de unión a colina se seleccionan entre el grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Otra realización preferida es truncamientos de CbpX donde "CbpX" se ha definido anteriormente y "truncamiento" se refiere a proteínas CbpX que carecen del 50% o más de la región de unión a colina (C). Preferiblemente, dichas proteínas carecen de la región de unión a colina completa. Más preferiblemente, dichos truncamientos de proteína carecen (i) la región de unión a colina y (ii) una parte de la mitad N-terminal de la proteína también, reteniendo al mismo tiempo al menos una región repetida (R1 o R2). Aún más preferiblemente, el truncamiento tiene dos regiones repetidas (R1 y R2). Ejemplos de dichas realizaciones preferidas son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en el documento WO99/51266 o el documento WO99/51188, sin embargo, también se contemplan otras proteínas de unión a colina que carecen de una región de unión a colina similar dentro del alcance de esta invención.

La familia LytX son proteínas asociadas a membrana asociadas a la lisis celular. El dominio N-terminal comprende dominio o dominios de unión a colina, sin embargo, la familia LytX no tiene todas las características encontradas en la familia CbpA indicadas anteriormente y por tanto para la presente invención la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio C-terminal contiene el dominio catalítico de la familia de proteína LytX. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia LytX, LytA se describe en Ronda y col., Eur J Biochem, 164:624-624 (1997). LytB se describe en el documento WO98/18930, y también se conoce como Sp46. LytC también se describe en el documento WO98/18930, y también se conoce como Sp91. Un miembro preferido de esa familia es LytC.

Otra realización preferida son truncamientos LytX donde "LytX" se ha definido anteriormente y "truncamientos" se refiere a proteínas LytX que carecen del 50% o más de la región de unión a colina. Preferiblemente, dichas proteínas carecen de la región de unión a colina completa. Otra realización preferida más de esta invención es proteínas quiméricas (o fusiones) truncamiento CbpX-truncamiento LytX. Preferiblemente esto comprende NR1xNR2 (o R1xR2) de CbpX y la parte C-terminal (Cterm, es decir, que carece de los dominios de unión a colina) de LytX (por ejemplo, LytCCterm o Sp91 Cterm). Más preferiblemente, CbpX se selecciona entre el grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Más preferiblemente aún, es CbpA. Preferiblemente, LytX es LytC (también conocido como Sp91). En otra realización de la presente invención es un truncamiento PspA o PsaA que carece del dominio de unión a colina (C) y se expresa como una proteína de fusión con LytX. Preferiblemente, LytX es LytC.

Con respecto a PsaA y PspA, ambas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, PsaA y variantes de delección transmembrana de la misma se han descrito por Berry y Paton, Infect Immun 1996 Dic; 64(12):5255-62. PspA y variantes de delección transmembrana de la misma se han descrito en, por ejemplo, el documento US5804193, el documento WO92/14488, y el documento WO99/53940.

Sp128 y Sp130 se describen en el documento WO00/76540. Sp125 es un ejemplo de una proteína superficial de neumococos con el motivo de anclaje a la pared celular de LPXTG (donde X es cualquier aminoácido). Cualquier proteína dentro de esta clase de proteínas superficiales de neumococos con este motivo se ha hallado útil dentro del contexto de esta invención, y por lo tanto se considera una proteína adicional de la invención. La propia Sp125 se describe en el documento WO98/18930, y también se conoce como ZmpB - una metaloproteínasa de zinc. Sp101 se describe en el documento WO98/06734 (donde tiene el número de referencia y85993). Se caracteriza por una secuencia señal Tipo I. Sp133 se describe en el documento WO98/06734 (donde tiene el número de referencia y85992). También se caracteriza por una secuencia señal Tipo I.

Ejemplos de antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* preferidos que pueden incluirse en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [documento WO97/41731 (Antex) y documento WO96/34960 (PMC)]; OMP21 o fragmentos de los mismos (documento WO0018910); LbpA y/o LbpB [documento WO98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documento WO97/13785 y documento WO97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (documento PCT/EP99/03824); PilQ (documento PCT/EP99/03823); OMP85 (documento PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 991797,2); lipo10 (documento GB 9918208,1); lipo11 (documento GB 9918302,2); lipo18 (documento GB 9918038,2); P6 (documento PCT/EP99/03038); D15 (documento PCT/EP99/03822); OmpIA1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE. Ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipificables o fragmentos de los mismos que pueden incluirse en una

vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: la proteína fimbria [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma [por ejemplo, fusiones del péptido LB1(f); documento US 5843464 (OSU) o documento WO99/64067]; OMP26 [documento WO97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO94/12641); P2; y P5 (documento WO94/26304).

Las proteínas de la invención también pueden combinarse de forma beneficiosa. Por combinado se entiende que la composición inmunogénica comprende todas las proteínas de las siguientes combinaciones, como proteínas vehículo o como proteínas libres o una mezcla de las dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas expuesta anteriormente en este documento, ambas proteínas pueden usarse como proteínas vehículo, o ambas proteínas pueden estar presentes como proteínas libres, o ambas pueden estar presentes como proteína vehículo y proteína libre, o un puede estar presente como proteína vehículo y una proteína libre mientras que la otra está presente solamente como una proteína vehículo o solamente como una proteína libre, o pueden estar presentes como proteína vehículo y la otra como proteína libre. Cuando se da una combinación de tres proteínas, existen posibilidades similares. Las combinaciones preferidas incluyen, aunque sin limitación, PhtD + NR1xR2, PhtD + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterm, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferiblemente, NR1xR2 (or R1xR2) es de CbpA o PspC. Más preferiblemente, es de CbpA. Otras combinaciones incluyen tres combinaciones proteicas tales como PhtD + NR1xR2 + Ply, y PhtA + NR1xR2 + PhtD. En una realización, la composición de vacuna comprende neumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas vehículo. En una realización adicional, la composición de vacuna comprende neumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas libres.

La presente invención proporciona adicionalmente una vacuna que comprende las composiciones inmunogénicas de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden adyuvantarse, particularmente cuando se pretenden para su uso en una población anciana pero también para su uso en poblaciones de bebés. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alumbre, pero también puede ser una sal de calcio, magnesio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, sacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados, o polifosfazenos.

Se prefiere que el adyuvante se seleccione para que sea un inductor preferencial de un tipo Th1 de respuesta. Dichos altos niveles de citoquinas tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células contra un antígeno dado, mientras que altos niveles de citoquinas tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales contra el antígeno.

La distinción de una respuesta inmune tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo soportará una respuesta inmune que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de lo descrito en clones murinos de células T CD4 positivas por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173)). Tradicionalmente, las respuestas Th1 están asociadas con la producción de citoquinas INF- $\gamma$  e IL-2 por linfocitos T. Otras citoquinas a menudo directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunes tipo Th1 no se producen por células T, tales como IL-12. En contraste, las respuestas tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Los sistemas adyuvantes adecuados que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen: monofosforil lípido A o un derivado del mismo, particularmente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación véase el documento GB 2220211 A); y una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con una sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En dichas combinaciones, el antígeno y el 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, permitiendo un suministro más eficaz de señales antigénicas e inmunoestimuladoras. Los estudios han demostrado que 3D-MPL es capaz de potenciar adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en alumbre [Thoelen y col. Vaccine (1998) 16: 708-14; documento EP 689454-B1].

Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 está inactivado con colesterol como se describe en el documento WO96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol es una emulsión de aceite en agua que se describe en el documento WO95/17210. En una realización, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una saponina, que puede ser QS21. La formulación también comprende una emulsión de aceite en agua y tocoferol (documento WO95/17210). Oligonucleótidos que contienen CpG no metilado (documento WO96/02555) y otros oligonucleótidos inmunomoduladores (documento WO0226757 y documento WO03507822) también son inductores preferentes de una respuesta TH1 y son adecuados para su uso en la presente invención.

Adyuvantes particulares son aquellos seleccionados entre el grupo de sales de metales, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores tipo Toll (en particular el agonista del receptor tipo Toll 2, el agonista del receptor tipo Toll 3, el agonista del receptor tipo Toll 4, el agonista del receptor tipo Toll 7, el agonista del receptor tipo Toll 8 y el agonista del receptor tipo Toll 9), saponinas o combinaciones de los mismos.

5 Un adyuvante que puede usarse con las composiciones de vacuna de la invención son preparaciones de ampolla o de vesículas de membrana externa de cepas bacterianas Gram negativas tales como las mostradas por el documento WO02/09746 - particularmente ampollas de *N. meningitidis*. Las propiedades adyuvantes de las ampollas pueden mejorarse reteniendo el LOS (lipooligosacárido) en superficie (por ejemplo, a través de la extracción con bajas concentraciones de detergente [por ejemplo desoxicolato al 0-0,1%]). El LOS puede  
10 destoxicarse a través de las mutaciones msmM(-) o htrB(-) analizadas en el documento WO02/09746. Las propiedades adyuvantes también pueden mejorarse reteniendo PorB (y opcionalmente eliminando PorA) de ampollas de meningococos. Las propiedades adyuvantes también pueden mejorarse truncando la estructura de sacáridos del núcleo exterior de LOS en ampollas de meningococos - por ejemplo, mediante la mutación lgtB(-) analizada en el documento WO2004/014417. Como alternativa, el LOS mencionado anteriormente (por ejemplo,  
15 aislado de una cepa msbB(-) y/o lgtB(-)) puede purificarse y usarse como adyuvante en las composiciones de la invención.

Un adyuvante adicional que puede usarse con las composiciones de la invención puede seleccionarse entre el grupo: una saponina, lípido A o un derivado del mismo, un oligonucleótido inmunoestimulador, un fosfato de alquil glucosaminida, una emulsión de aceite en agua o combinaciones de los mismos. Un adyuvante preferido adicional  
20 es una sal metálica en combinación con otro adyuvante. Se prefiere que el adyuvante sea un agonista del receptor tipo Toll en particular un agonista de un receptor tipo Toll 2, 3, 4, 7, 8 ó 9, o una saponina, en particular Qs21. Se prefiere adicionalmente que el sistema adyuvante comprenda dos o más adyuvantes de la lista anterior. En particular, las combinaciones preferiblemente contienen un adyuvante de saponina (en particular Qs21) y/o un agonista del receptor tipo Toll 9 tal como un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG. Otras  
25 combinaciones preferidas comprenden una saponina (en particular Qs21) y un agonista del receptor tipo Toll 4 tal como monofosforil lípido A o su derivado 3-desacilado, 3D-MPL, o una saponina (en particular Qs21) y un ligando del receptor tipo Toll 4 tal como un fosfato de alquil glucosaminida.

Adyuvantes particularmente preferidos son combinaciones de 3D-MPL y Qs21 (documento EP0671948B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y Qs21 (documento WO95/17210, documento  
30 WO98/56414), o 3D-MPL formulado con otros vehículos (documento EP 0 689 454 B1). Otros sistemas adyuvantes preferidos comprenden una combinación de 3D-MPL, Qs21 y un oligonucleótido CpG como se describe en el documento US6558670, documento US6544518.

En una realización, el adyuvante es (o comprende) un ligando del receptor tipo Toll (TLR) 4, preferiblemente un agonista tal como un derivado de lípido A particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil  
35 lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

El 3D-MPL está disponible en GlaxoSmithKline Biologicals North America y principalmente promueve las respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Puede producirse de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Preferiblemente, en las composiciones de la presente invención se usa 3D-MPL de partícula  
40 pequeña. El 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula de modo que puede filtrarse a esterilidad a través de un filtro de 0,22 µm. Dichas preparaciones se describen en la solicitud de patente internacional N° WO94/21292. Se conocen derivados sintéticos de lípido A y se cree que son agonistas de TLR4 incluyendo, aunque sin limitación:

45 OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO95/14026).

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino] decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documento WO99 /64301 y documento WO 00/0462).

OM 197 MP-Ac DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoil amino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127).

50 Otros ligandos TLR4 que pueden usarse son fosfatos de alquil glucosaminida (AGP) tales como los descritos en el documento WO9850399 o el documento US6303347 (también se describen procedimientos para la preparación de AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se describe en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Otro inmunoestimulador preferido para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de Sur América Quillaja Saponaria Molina y se describió por primera vez  
55 teniendo actividad adyuvante por Dalsgaard y col., en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254). Los fragmentos purificados de Quil A se han aislado por

HPLC que retienen actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de Quillaja Saponaria Molina que induce células T citotóxicas CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

- 5 Se han descritos formulaciones particulares de QS21 que son particularmente preferidas, comprendiendo adicionalmente estas formulaciones un esteroide (documento WO96/33739). Las saponinas que forman parte de la presente invención pueden separarse en forma de micelas, micelas mixtas (preferentemente, pero no exclusivamente con sales biliares) o pueden estar en forma de matrices ISCOM (documento EP 0 109 942 B1), liposomas o estructuras coloidales relacionadas tales como complejos multiméricos tipo gusano o tipo anillo o
- 10 estructuras lipídicas/estratificadas y lamelas cuando se formulan con colesterol y lípidos, o en forma de una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, en el documento WO 95/17210). Las saponinas pueden asociarse preferiblemente con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287).

Preferiblemente, la saponina está presente en forma de un liposoma, ISCOM o una emulsión de aceite en agua.

- 15 Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A (o lípido A destoxificado) y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 está inactivado con colesterol como se describe en el documento WO 96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que implica tocoferol con o sin QS21 y/o 3D-MPL en emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210. En una realización, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una saponina, que puede ser QS21.

- 20 También pueden usarse oligonucleótidos inmunoestimuladores o cualquier otro agonista del receptor tipo Toll (TLR) 9. Los oligonucleótidos preferidos para su uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, preferiblemente que contienen dos o más motivos CpG dinucleotídicos separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son
- 25 típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos están dentro del alcance de la invención. También se incluyen dentro del alcance de la invención oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos mixtos. Los procedimientos para producir oligonucleótidos fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos US5.666.153, US5.278.302 y WO95/26204.

- 30 Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen preferiblemente enlaces internucleotídicos modificados con fosforotioato.

OLIGO 1 (SEC ID Nº 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEC ID Nº 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEC ID Nº 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

- 35 OLIGO 4 (SEC ID Nº 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEC ID Nº 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEC ID Nº 6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

Oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores que tienen deleciones o adiciones irrelevantes en las mismas.

- 40 Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención pueden sintetizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, véase el documento EP 468520). Convenientemente, dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automatizado.

- El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua o puede comprender una emulsión de aceite en agua en combinación con otros adyuvantes. La fase oleosa del sistema de emulsión preferiblemente comprende un aceite metabolizable. El significado de la expresión aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable puede definirse como "que es capaz de transformarse por metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o sintético, que sea no tóxico para el destinatario y sea capaz de transformarse por metabolismo. Los frutos, semillas, y granos son fuentes habituales de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de esta
- 45 invención y pueden incluir aceites disponibles en el mercado tales como NEOBEE® y otros. El escualeno (2,6,10,15,19, 23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en menores cantidades en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de afrecho de arroz y levaduras, y es un aceite particularmente preferido para su uso en esta
- 50

invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis del colesterol (Merck index, 10ª Edición, N° de entrada 8619).

5 Los tocoles (por ejemplo, vitamina E) también se usan a menudo en adyuvantes de emulsiones oleosas (documento EP 0 382 271 B1; documento US5667784; documento WO95/17210). Los tocoles usados en las emulsiones oleosas (preferiblemente emulsiones de aceite en agua) de la invención pueden formularse como se describe en el documento EP 0 382 271 B1, porque los tocoles pueden ser dispersiones de gotas de tocol, que comprenden opcionalmente un emulsionante, de preferiblemente menos de 1 micrómetro de diámetro. Como alternativa, los tocoles pueden usarse en combinación con otro aceite, para formar la fase oleosa de una emulsión oleosa. Los ejemplos de emulsiones oleosas que pueden usarse en combinación con el tocol se describen en este documento, tal como los aceites metabolizables descritos anteriormente.

10 Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua per se se han sugerido como útiles como composiciones adyuvantes (documento EP 0 399 843B), también combinaciones emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos se han descrito como adyuvantes para vacunas (documento WO95/17210; documento WO98/56414; documento WO99/12565; documento WO99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsión oleosa, tales como emulsiones de agua en aceite (documento US 5.422.109, documento EP 0 480 982 B2) y emulsiones de agua en aceite en agua (documento US 5.424.067; documento EP 0 480 981 B). Todos estos forman sistemas de emulsión oleosa preferidos (en particular cuando se incorporan tocoles) para formar adyuvantes y composiciones de la presente invención.

15 Mucho más preferiblemente, la emulsión oleosa (por ejemplo, emulsiones de aceite en agua) comprende adicionalmente un emulsionante tal como TWEEN 80 y/o un esteroles tal como colesterol.

20 Una emulsión oleosa preferida (preferiblemente emulsión de aceite en agua) comprende un aceite no tóxico metabolizable, tal como escualano, escualeno o un tocoferol tal como alfa tocoferol (y preferiblemente tanto escualeno como alfa tocoferol) y opcionalmente un emulsionante (o tensioactivo) tal como TWEEN 80. También puede incluirse un esteroles (preferiblemente colesterol).

25 El procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido para los especialistas en la técnica. Habitualmente, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa que contiene tocol con un tensioactivo tal como una solución de PBS/TWEEN80™, seguido por homogeneización usando un homogeneizador, quedando claro para un especialista en la técnica que un procedimiento que comprenda pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsificación en microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una presión máxima de entrada de 600 kPa (6 bar) (presión de salida de aproximadamente 85 MPa (850 bar))) podría adaptarse por un especialista en la técnica para producir volúmenes más pequeños o más grandes de emulsión. La adaptación podría conseguirse por experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se consiga una preparación con gotas de aceite del diámetro requerido. En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante deben estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

30 El tamaño de las gotas de aceite encontradas dentro de la emulsión de aceite en agua estable es preferiblemente de menos de 1 micrómetro, puede estar en el intervalo de substancialmente 30-600 nm, preferiblemente de substancialmente alrededor de 30-500 nm de diámetro, y mucho más preferiblemente de substancialmente 150-500 nm de diámetro, y en particular aproximadamente 150 nm de diámetro medido por espectroscopía de correlación de fotones. A este respecto, el 80% de las gotas de aceite en número debe estar dentro de los intervalos preferidos, más preferiblemente más del 90% y mucho más preferiblemente más del 95% de las gotas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones oleosas de la presente invención están convencionalmente en el intervalo del 0,5-20% o del 2 al 10% de aceite (del volumen de dosis total), tal como escualeno; y cuando está presente, del 2 al 10% de alfa tocoferol; y de 0,3 al 3% de tensioactivo, tal como monooleato de polioxietilensorbitán. Preferiblemente, la proporción de aceite (preferiblemente escualeno): tocol (preferiblemente  $\alpha$ -tocoferol) es igual o menor a 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Un emulsionante, tal como TWEEN80 o Span85 también puede estar presente a un nivel de aproximadamente el 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante.

35 Ejemplos de sistemas de emulsión preferidos se describen en los documentos WO95/17210, WO99/11241 y WO99/12565 que describen adyuvantes de emulsión basados en escualeno,  $\alpha$ -tocoferol, y TWEEN80, opcionalmente formulados con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL. Por tanto, en una realización particularmente preferida de la presente invención, el adyuvante de la invención puede comprender adicionalmente inmunoestimulantes adicionales, tales como LPS o derivados del mismo, y/o saponinas. En este documento se describen ejemplos de inmunoestimulantes adicionales y en "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, New York y London, ISBN 0-306-44867-X.

En un aspecto preferido, el adyuvante y las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención comprenden una saponina (preferiblemente QS21) y/o un derivado de LPS (preferiblemente 3D-MPL) en una emulsión oleosa descrita anteriormente, opcionalmente con un esteroil (preferiblemente colesterol). Adicionalmente, la emulsión oleosa (preferiblemente emulsión de aceite en agua) puede contener Span85 y/o lecitina y/o tricaprulina. Se describen adyuvantes que comprenden una emulsión de aceite en agua, un esteroil y una saponina en el documento WO99/12565.

Típicamente para administración a seres humanos, la saponina (preferiblemente QS21) y/o derivado de LPS (preferiblemente 3D-MPL) estarán presentes en una dosis humana de la composición inmunogénica en el intervalo de 1 µg - 200 µg, tal como 10 - 100 µg, preferiblemente 10 µg - 50 µg por dosis. Típicamente, la emulsión oleosa (preferiblemente emulsión de aceite en agua) comprenderá del 2 al 10% de aceite metabolizable. Preferiblemente, comprenderá del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de alfa tocoferol y del 0,3 al 3% (preferiblemente 0,4 - 2%) de emulsionante (preferiblemente TWEEN80 [polioxi-etileno sorbitán monooleato]). Cuando están presentes tanto el escualeno como el alfa tocoferol, preferiblemente la proporción de escualeno:alfa tocoferol es igual a o menor de 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. El Span85 (trioleato de sorbitán) también puede estar presente a un nivel del 0,5 al 10% en las emulsiones usadas en la invención. En algunos casos puede ser ventajoso que las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante, por ejemplo, otros emulsionantes/tensioactivos, incluyendo ácido caprílico (Merck index 10ª Edición, N° de entrada 1739), de los cuales la tricaprulina es particularmente preferida.

Cuando se incluyen escualeno y una saponina (preferiblemente QS21), es beneficioso también incluir un esteroil (preferiblemente colesterol) a la formulación ya que esto permite una reducción en el nivel total de aceite en la emulsión. Esto conduce a un coste reducido de fabricación, una mejora de la comodidad global de la vacunación, y también mejoras cualitativas y cuantitativas de las respuestas inmunes resultantes, tales como producción mejorada de IFN-γ. Por consiguiente, el sistema adyuvante de la presente invención típicamente comprende una proporción de aceite metabolizable:saponina (p/p) en el intervalo de 200:1 a 300:1, y también la presente invención puede usarse en una forma de "bajo contenido de aceite" cuyo intervalo preferido es de 1:1 a 200:1, preferiblemente de 20:1 a 100:1 y mucho más preferiblemente de sustancialmente 48:1, reteniendo esta vacuna las propiedades adyuvantes beneficiosas de todos los componentes, con un perfil de reactogenicidad muy reducido. Por consiguiente, las realizaciones particularmente preferidas tienen una proporción de escualeno:QS21 (p/p) en el intervalo de 1:1 a 250:1, también un intervalo preferido es de 20:1 a 200:1, preferiblemente de 20:1 a 100:1, y mucho más preferiblemente de sustancialmente 48:1. Preferiblemente también se incluye un esteroil (más preferiblemente colesterol) presente a una proporción de saponina:esteroil como se describe en este documento.

Los sistemas de emulsión de la presente invención preferiblemente tienen un tamaño de gota de aceite pequeño en el intervalo submicrométrico. Más preferiblemente los tamaños de gota de aceite estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, y mucho más preferiblemente de 120-600 nm de diámetro.

Una formulación adyuvante particularmente potente (para la combinación final con AIPO4 en las composiciones inmunogénicas de la invención) implica una saponina (preferiblemente QS21), un derivado de LPS (preferiblemente 3D-MPL) y una emulsión oleosa (preferiblemente escualeno y alfa tocoferol en una emulsión de aceite en agua) como se describe en el documento WO 95/17210 o en el documento WO 99/12565 (en particular la formulación adyuvante 11 del Ejemplo 2, Tabla 1).

Los ejemplos de un agonista de TLR 2 incluyen peptidoglicano o lipoproteína. La imidazoquinolinas, tales como imiquimod y resiquimod son agonistas conocidos de TLR7. El ARN monocatenario también es un agonista de TLR conocido (TLR8 en seres humanos y TLR7 en ratones), mientras que el ARN bicatenario y poli IC (ácido poliinosínico-policitidílico - un mimético sintético comercial de ARN viral) son agonistas de TLR 3 ejemplares. 3D-MPL es un ejemplo de un agonista de TLR4 mientras que CPG es un ejemplo de un agonista de TLR9.

La composición inmunogénica puede comprender un antígeno y un inmunoestimulante adsorbidos en una sal metálica. Las formulaciones de vacuna basadas en aluminio donde el antígeno y el inmunoestimulante monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), se adsorben en la misma partícula se describen en el documento EP 0 576 478 B1, el documento EP 0 689 454 B1, y el documento EP 0 633 784 B1. En estos casos el antígeno se adsorbe primero en la sal de aluminio seguido de la adsorción del inmunoestimulante 3D-MPL en las mismas partículas de sal de aluminio. Dichos procedimientos primero implican la suspensión of 3D-MPL por sonicación en un baño de agua hasta que las partículas alcanzan un tamaño entre 80 y 500 nm. El antígeno típicamente se adsorbe en sal de aluminio durante una hora a temperatura ambiente en agitación. La suspensión de 3D-MPL después se añade al antígeno adsorbido y la formulación se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se mantiene a 4°C hasta su uso.

En otro procedimiento, el inmunoestimulante y el antígeno están en partículas metálicas diferentes, como se describe en el documento EP 1126876. El procedimiento mejorado comprende la adsorción del inmunoestimulante en una partícula de sal metálica, seguida de la adsorción del antígeno en otra partícula de sal metálica, seguida de la mezcla de las partículas metálicas discretas para formar una vacuna. El adyuvante para su uso en la presente invención puede ser una composición adyuvante que comprende un inmunoestimulante, adsorbido en una partícula de sal metálica, caracterizada porque la partícula de sal metálica está sustancialmente libre de otro antígeno.



Además, las vacunas se proporcionan por la presente invención y se caracterizan porque el inmunoestimulante se adsorbe en partículas de sal metálica que están sustancialmente libres de otro antígeno, y porque las partículas de sal metálica que se adsorben en el antígeno están sustancialmente libres de otro inmunoestimulante.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona una formulación adyuvante que comprende un inmunoestimulante que se ha adsorbido en una partícula de una sal metálica, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de otro antígeno. Además, esta formulación adyuvante puede ser un intermedio que, si se usa dicho adyuvante, es necesario para la fabricación de una vacuna. Por consiguiente, se proporciona un procedimiento para la fabricación de una vacuna que comprende mezclar una composición adyuvante que es uno o más inmunoestimulantes adsorbidos en una partícula metálica con un antígeno. Preferiblemente, el antígeno se ha pre-adsorbido en una sal metálica. Dicha sal metálica puede ser idéntica o similar a la sal metálica que está adsorbida en el inmunoestimulante. Preferiblemente, la sal metálica es una sal de aluminio, por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

10 La presente invención proporciona adicionalmente una composición de vacuna que comprende inmunoestimulante adsorbido en una primera partícula de una sal metálica, y antígeno adsorbido en una sal metálica, caracterizada porque la primera y segunda partículas de sal metálica son partículas diferentes.

15 Se ha designado que el LPS o los derivados o mutaciones de LOS o los derivados de lípido A descritos en este documento son menos tóxicos (por ejemplo, 3D-MPL) que los lipopolisacáridos nativos y son equivalentes intercambiables con respecto a cualquier uso de estos restos descritos en este documento. Pueden ser ligandos de TLR4 como se ha descrito anteriormente. Otros de estos derivados se describen en el documento WO020786737, el documento WO9850399, el documento WO0134617, el documento WO0212258, el documento WO03065806.

20 En una realización el adyuvante usado para las composiciones de la invención comprende un vehículo de liposoma (preparado por técnicas conocidas a partir de un fosfolípido (tal como dioleoil fosfatidil colina [DOPC]) y opcionalmente un esteroil [tal como colesterol]). Dichos vehículos de liposoma pueden portar derivados de lípido A [tales como 3D-MPL - véase anteriormente] y/o saponinas (tales como QS21 - véase anteriormente). En una realización, el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,1-10 mg, 0,2-7, 0,3-5, 0,4-2, ó 0,5-1 mg (por ejemplo, 0,4-0,6, 0,9-1,1, 0,5 ó 1 mg) de fosfolípido (por ejemplo DOPC), 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, ó 0,125-0,25 mg (por ejemplo, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 ó 0,125 mg) de esteroil (por ejemplo colesterol), 5-60, 10-50, ó 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL), y 5-60, 10-50, ó 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de saponina (por ejemplo QS21).

30 Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones de vacuna para ancianos. En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacáridos derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender uno o más de los serotipos 3, 6A, y 22F), donde el título GMC de anticuerpos inducido contra uno o más (o todos) los componentes de la vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en vacunados humanos.

35 En una realización, el adyuvante usado para las composiciones de la invención comprende una emulsión de aceite en agua preparada a partir de un aceite metabolizable (tal como escualeno), un emulsionante (tal como Tween 80) y opcionalmente un tocol (tal como alfa tocoferol). En una realización, el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,5-15, 1-13, 2-11, 4-8, ó 5-6 mg (por ejemplo, 2-3, 5-6, ó 10-11 mg) de aceite metabolizable (tal como escualeno), 0,1-10, 0,3-8, 0,6-6, 0,9-5, 1-4, ó 2-3 mg (por ejemplo, 0,9-1,1, 2-3 ó 4-5 mg) de emulsionante (tal como Tween 80) y opcionalmente 0,5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 mg (por ejemplo, 11-13, 5-6, ó 2-3 mg) de tocol (tal como alfa tocoferol).

Este adyuvante adicionalmente puede comprender opcionalmente 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).

45 Estos adyuvantes son particularmente adecuados para formulaciones de vacuna para bebés o ancianos. En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacárido derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender uno o más de los serotipos 3, 6A, y 22F), donde el título GMC de anticuerpos inducido contra uno o más (o todos) los componentes de vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en vacunados humanos.

50 Este adyuvante puede contener opcionalmente 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, ó 0,125-0,25 mg (por ejemplo, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 ó 0,125 mg) de esteroil (por ejemplo colesterol), 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL), y 5-60, 10-50, ó 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de saponina (por ejemplo QS21).

55 Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones de vacuna para ancianos. En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacárido derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender uno o más de los serotipos 3, 6A, y 22F), donde el título GMC de anticuerpos inducido contra uno o más (o todos) los componentes de

vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en vacunados humanos.

5 En una realización, el adyuvante usado para las composiciones de la invención comprende fosfato de aluminio y un derivado de lípido A (tal como 3D-MPL). Este adyuvante puede comprender (por dosis de 0,5 ml) 100-750, 200-500, ó 300-400 µg de Al en forma de fosfato de aluminio, y 5-60, 10-50, ó 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).

10 Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones de vacuna para ancianos o bebés. En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacárido derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender uno o más de los serotipos 3, 6A, y 22F), donde el título GMC de anticuerpos inducido contra uno o más (o todos) los componentes de vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en vacunados humanos.

15 Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible de infección, mediante la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración mucosa al tracto oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de la neumonía o la otitis media (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede evitarse de forma más eficaz, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede administrarse en forma de una única dosis, los componentes de la misma también pueden co-administrarse juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, podrían administrarse conjugados de sacárido de neumococos por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquiera de los componentes proteicos bacterianos de la vacuna para una coordinación óptima de las respuestas inmunes con respecto a cada uno de los otros). Para la co-administración, puede estar presente el adyuvante Th1 opcional en cualquier o en todas las diferentes administraciones. Además de una única vía de administración, pueden usarse 2 vías diferentes de administración. Por ejemplo, los sacáridos o conjugados de sacárido pueden administrarse IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse IM para las dosis de sensibilización e IN para las dosis de refuerzo

30 El contenido de antígenos proteicos en la vacuna típicamente estará en el intervalo de 1-100 µg, preferiblemente 5-50 µg, muy típicamente en el intervalo de 5-25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

La preparación de vacuna se describe en líneas generales en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación en liposomas se describe por Fullerton, patente de Estados Unidos 4.235.877.

35 Las vacunas de la presente invención pueden almacenarse en solución o liofilizadas. Preferiblemente la solución se liofiliza en presencia de un azúcar tal como sacarosa o lactosa. Es adicionalmente preferible que se liofilicen y se reconstituyan de forma improvisada antes de su uso. La liofilización puede producir una composición más estable (vacuna) y posiblemente puede conducir a mayores títulos de anticuerpo en presencia de 3D-MPL y en ausencia de un adyuvante basado en aluminio.

40 En un aspecto de la invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende adicionalmente un vial que contiene un adyuvante como se describe en este documento. Se prevé que en este aspecto de la invención, el adyuvante se usará para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

45 Aunque las vacunas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "callosa" externa, llamada capa córnea, que cubre la epidermis. Por debajo de esta epidermis hay una capa llamada dermis, que a su vez cubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular la dermis, estimula una respuesta inmune, que también puede asociarse a varias ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en este documento forma una característica preferida de la presente invención.

50 La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento de mantoux", comprende las etapas de limpiar la piel, y después estirar con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) enfocando hacia arriba se inserta la aguja a un ángulo entre 10-15°. Una vez se ha insertado el bisel de la aguja, se baja el cuerpo de la aguja y se hace avanzar adicionalmente mientras se proporciona una ligera presión para elevarlo por debajo de la piel. Entonces se inyecta el líquido muy lentamente formado de este modo una ampolla o burbuja sobre la superficie cutánea, seguido de la lenta extracción de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que están específicamente diseñados para administrar agentes

- líquidos al interior de o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección con boquilla descritos, por ejemplo, en los documentos WO 01/13977; US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Procedimientos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para el suministro balístico de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documento WO 97/48440; documento WO 98/28037); o pueden aplicarse a la superficie de la piel (suministro transdérmico o transcutáneo, documento WO 98/20734; documento WO 98/28037).
- 5
- 10 Cuando las vacunas de la presente invención tienen que administrarse a la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un bajo volumen líquido, particularmente un volumen entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.
- El contenido de antígenos en las vacunas cutáneas o intradérmicas de la presente invención puede ser similar a las dosis convencionales halladas en vacunas intramusculares (véase anteriormente). Sin embargo, una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas es que las formulaciones pueden ser de "baja dosis". Por consiguiente, los antígenos proteicos en las vacunas de "baja dosis" están preferiblemente presentes en una cantidad tan pequeña como de 0,1 a 10 µg, preferiblemente de 0,1 a 5 µg por dosis; y los antígenos sacáridos (preferiblemente conjugados) pueden estar presentes en el intervalo de 0,01-1 µg, y preferiblemente entre 0,01 y 0,5 µg de sacárido por dosis.
- 15
- 20 Como se usa en este documento, la expresión "suministro intradérmico" significa el suministro de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no tiene que localizarse necesariamente de forma exclusiva en la dermis. La dermis es la capa de la piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm desde la superficie en la piel humana, pero hay una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, puede esperarse alcanzar la dermis yendo 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis está localizada entre la capa córnea y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea por debajo. Dependiendo del modo de suministro, la vacuna finalmente puede localizarse solamente o principalmente dentro de la dermis, o finalmente puede distribuirse dentro de la epidermis y la dermis.
- 25
- La presente invención proporciona adicionalmente una vacuna mejorada para la prevención o mejora de la otitis media causada por *Haemophilus influenzae* mediante la adición de proteínas de *Haemophilus influenzae*, por ejemplo, la proteína D en forma libre o conjugada. Además, la presente invención proporciona adicionalmente una vacuna mejorada para la prevención o mejora de infección con neumococos en bebés (por ejemplo, otitis media), basándose en la adición de una o dos proteínas de neumococos en forma de proteína libre o conjugada a las composiciones de conjugado de *S. pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas libres de neumococos pueden ser iguales o diferentes a cualquier proteína de *S. pneumoniae* usada como proteína vehículo. También pueden incluirse uno o más antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* en la vacuna de combinación en forma libre o conjugada. Por tanto, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmune (protectora) contra la otitis media en bebés.
- 30
- 35
- En otra realización, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmune (protectora) en bebés (definidos como de 0-2 años de edad en el contexto de la presente invención) administrando una cantidad segura y eficaz de la vacuna de la invención [una vacuna pediátrica]. Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen proporcionar las composiciones de conjugado de *S. pneumoniae* antigénico de la invención para su uso en medicina y el uso de los conjugados de *S. pneumoniae* de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención (o tratamiento) de una enfermedad por neumococos.
- 40
- En otra realización más, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmune (protectora) en la población anciana (en el contexto de la presente invención un paciente se considera anciano si tiene una edad de 50 años o más, típicamente más de 55 años y más generalmente más de 60 años) administrando una cantidad segura y eficaz de la vacuna de la invención, preferiblemente junto con una o dos proteínas de *S. pneumoniae* presentes en forma de proteína libre o conjugada, siendo dichas proteínas de *S. pneumoniae* libres iguales o diferentes de cualquier proteína de *S. pneumoniae* usada como proteína vehículo.
- 45
- 50 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para inmunizar un huésped humano contra enfermedades causadas por *S. pneumoniae* y opcionalmente la infección por *Haemophilus influenzae* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención.
- Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por *S. pneumoniae* y opcionalmente la infección por *Haemophilus influenzae*.
- 55
- Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por *S. pneumoniae* y opcionalmente la infección por *Haemophilus influenzae*.

Las expresiones "que comprende", "comprende" y "comprenden" en este documento los inventores entienden que son opcionalmente sustituibles por las expresiones "que consiste en", "consiste en" y "consisten en", respectivamente, en cada caso.

5 Las realizaciones de este documento que se refieren a "composiciones de vacuna" de la invención también son aplicables a realizaciones que se refieren a "composiciones inmunogénicas" de la invención, y viceversa.

Todas las referencias o solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva de patente es incorporan por referencia en este documento.

Para que esta invención se entienda mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para propósitos de ilustración solamente, y no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo.

10 **Ejemplos**

**Ejemplo 1: EXPRESIÓN DE PROTEÍNA D**

**Proteína D de *Haemophilus influenzae***

**Construcción genética para la expresión de proteína D**

**Materiales de partida**

15 **El ADN codificante de la proteína D**

La proteína D está altamente conservada entre *H. influenzae* de todos los serotipos y cepas no tipificables. El vector pHIC348 que contiene la secuencia de ADN que codifica el gen de la proteína D completa se ha obtenido del Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Suecia. La secuencia de ADN de la proteína D se ha publicado por Janson y col. (1991) *Infect. Immun.* 59: 119-125.

20 **La expresión del vector pMG1**

El vector de expresión pMG1 es un derivado de pBR322 (Gross y col., 1985) en el que se introdujeron los elementos de control derivados del bacteriófago  $\lambda$  para la transcripción y traducción de genes insertados foráneos (Shatzman y col., 1983). Además, se intercambi6 el gen de resistencia a ampicilina con el gen de resistencia a kanamicina.

**La cepa AR58 de *E. coli***

25 La cepa AR58 de *E. coli* se gener6 por transducción de N99 con un material en bruto del fago P1 previamente cultivado en un derivado SA500 (galE::TN10, lambdakil' cl857  $\Delta$ H1). N99 y SA500 son cepas de *E. coli* K12 derivadas del Dr. Martin Rosenberg's laboratory at the National Institute of Health.

**El vector de expresión pMG 1**

30 Para la producci6n de la prote6na D, se ha clonado el ADN que codifica la prote6na en el vector de expresi6n pMG 1. Este pl6smido utiliza se6ales del ADN del fago lambda para dirigir la transcripci6n y traducci6n de genes for6neos insertados. El vector contiene el promotor PL, el operador OL y dos sitios de utilizaci6n (NutL y NutR) para aliviar los efectos de polaridad transcripcional cuando se proporciona la prote6na N (Gross y col., 1985). Los vectores que contienen el promotor PL, se introducen en un hu6sped lisog6nico de *E. coli* para estabilizar el ADN plasm6dico. Las cepas hu6sped lisog6nicas contienen el ADN del fago lambda deficiente en la replicaci6n integrado en el genoma (Shatzman y col., 1983). El ADN del fago lambda cromos6mico dirige la s6ntesis de la prote6na represora cl que se une al represor OL del vector y evita la uni6n de la ARN polimerasa al promotor PL y de este modo la transcripci6n del gen insertado. El gen cl de la cepa de expresi6n AR58 contiene un mutante sensible a la temperatura de modo que la transcripci6n dirigida por PL pueda regularse por cambios de temperatura, es decir, un aumento en la temperatura de cultivo inactiva el represor y se inicia la s6ntesis de la prote6na for6nea. Este sistema de expresi6n permite la s6ntesis controlada de prote6nas for6neas especialmente de aquellas que pueden ser t6xicas para la c6lula (Shimataka y Rosenberg, 1981).

**La cepa AR58 de *E. coli***

35 La cepa de *E. coli* lisog6nica AR58 usada para la producci6n del veh6culo prote6na D es un derivado de la cepa N99 de *E. coli* K12 NIH convencional ( $F^-$  su $^-$  galK2, lacZ $^-$  thr $^-$ ). Contiene un fago lambda lisog6nico deficiente (galE::TN10, lambdakil' cl857  $\Delta$ H1). El fenotipo Kil' evita la interrupci6n de la s6ntesis macromolecular del hu6sped. La mutaci6n cl857 confiere una lesi6n sensible a la temperatura al represor cl. La delec6n  $\Delta$ H1 elimina el oper6n correcto del fago lambda y los loci bio, uvr3, y chlA del hu6sped. La cepa AR58 se gener6 por transducci6n de N99 con un material en bruto del fago P1 previamente cultivado en un derivado SA500 (galE::TN10, lambdakil' cl857  $\Delta$ H1). La introducci6n del lisog6n deficiente en N99 se seleccion6 con tetraciclina en virtud de la presencia de un transpos6n TN10 que codificaba resistencia a tetraciclina en el gen galE adyacente.

### Construcción del vector pMGMDPPrD

5 El vector pMG 1 que contiene el gen que codifica la proteína S1 no estructural del virus Influenzae (pMGNSI) se usó para construir pMGMDPPrD. El gen de la proteína D se amplificó por PCR a partir del vector pHC348 (Janson y col. 1991 Infect. Immun. 59:119-125) con cebadores de PCR que contenía sitios de restricción NcoI y XbaI en los extremos 5' y 3', respectivamente. El fragmento NcoI/XbaI después se introdujo en pMGNS1 entre NcoI y XbaI creando de este modo una proteína de fusión que contenía los 81 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 seguidos de la proteína PD. Este vector se llamó pMGNS1PrD.

10 En base a la construcción descrita anteriormente, se generó la construcción final para la expresión de la proteína D. Se retiró un fragmento BamHI/BamHI de pMGNS1PrD. Esta hidrólisis de ADN elimina la región codificante de NS1, excepto los tres primeros restos N-terminales. Después del religamiento del vector, se ha generado un gen que codifica una proteína de fusión con la siguiente secuencia de aminoácidos N-terminal:

-----MDP SSHSSNMANT-----

NS1 Proteína D

15 La proteína D no contiene un péptido líder o la cisteína N-terminal a la que normalmente se unen cadenas lipídicas. La proteína por lo tanto ni se excreta en el periplasma ni se lipida y permanece en el citoplasma en una forma soluble.

20 La construcción final pMG-MDPPrD se introdujo en la cepa huésped AR58 por choque térmico a 37°C. Se seleccionaron las bacterias que contenían plásmido en presencia de kanamicina. La presencia del inserto de ADN que codifica la proteína D se demostró por digestión del ADN plasmídico aislado con endonucleasas seleccionadas. La cepa recombinante de *E. coli* se menciona como ECD4.

La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor P<sub>L</sub>/operador O<sub>L</sub> lambda. La cepa huésped AR58 contiene un gen CI sensible a la temperatura en el genoma que bloquea la expresión de P<sub>L</sub> lambda a baja temperatura uniéndose a O<sub>L</sub>. Una vez se ha elevado la temperatura CI se libera de O<sub>L</sub> y se expresa la proteína D.

#### Preparación a pequeña escala

25 Al final de la fermentación, las células se concentran y congelan.

30 La extracción de células recogidas y la purificación de proteína D se realizaron del siguiente modo. El sedimento de cultivo celular congelado se descongela y se resuspende en una solución de alteración celular (tampón citrato pH 6,0) a una DO<sub>650</sub> final = 60. La suspensión se pasa dos veces a través de un homogenizador de alta presión a P = 100 MPa (1000 bar). El homogeneizado de cultivo celular se aclara por centrifugación y los desechos celulares se retiran por filtración. En la primera etapa de purificación, el lisado filtrado se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose Fast Flow). PD se une a la matriz de gel por interacción iónica y se eluye por un aumento en etapas de la fuerza iónica del tampón de elución.

En una segunda etapa de purificación se retienen las impurezas en una matriz de intercambio aniónico (Q Sepharose Fast Flow). PD no se une al gel y puede recogerse en el flujo continuo.

35 En ambas etapas de cromatografía en columna la recogida de fracciones se controla por DO. El flujo continuo de la cromatografía en columna de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra por ultrafiltración.

El material retenido de ultrafiltración que contiene la proteína D se pasa finalmente a través de una membrana de 0,2 µm.

#### 40 Preparación a gran escala

La extracción de las células recogidas y la purificación de la proteína D se realizaron del siguiente modo. El caldo recogido se enfría y se pasa directamente dos veces a través de un homogenizador de alta presión a una presión de aproximadamente 80 MPa (800 bar).

45 En la primera etapa de purificación, el homogeneizado de cultivo celular se diluye y se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (perlas SP Sepharose Big). PD se une a la matriz de gel por interacción iónica y se eluye por un aumento en etapas de la fuerza iónica del tampón de elución y se filtra.

En una segunda etapa de purificación se retienen las impurezas en una matriz de intercambio aniónico (Q Sepharose Fast Flow). PD no se une al gel y puede recogerse en el flujo continuo.

50 En ambas etapas de cromatografía en columna la recogida de fracciones se controla por DO. El flujo continuo de la cromatografía en columna de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra y se dialitza por ultrafiltración.

El material retenido de ultrafiltración que contiene la proteína D se pasa finalmente a través de una membrana de 0,2 µm.

#### Ejemplo 1b: Expresión de PhtD

5 La proteína PhtD es un miembro de la familia de proteínas de la triada de histidina (Pht) de neumococos caracterizada por la presencia de triadas de histidina (motivo HXXHXH). PhtD es una molécula de 838 aa y porta 5 triadas de histidina (véase MedImmune WO00/37105 SEC ID N° 4 para la secuencia de aminoácidos y SEC ID N° 5 para la secuencia de ADN). PhtD también contiene una región rica en prolina en el centro (posición de aminoácidos 348-380). PhtD tiene una secuencia señal N-terminal de 20 aa con un motivo LXXC.

#### Construcción genética

10 La secuencia génica de la proteína madura PhtD MedImmune (del aa 21 al aa 838) se transfirió de forma recombinante a *E. coli* usando el vector pTCMP14 del propio laboratorio que portaba el promotor  $\rho\lambda$ . La cepa huésped de *E. coli* es AR58, que porta el represor termosensible cl857, que permite la inducción por calor del promotor.

15 Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el gen *phtD* a partir de un plásmido MedImmune (que portaba el gen *phtD* de *Streptococcus pneumoniae* cepa Norway 4 (serotipo 4) - SEC ID N° 5 como se describe en el documento WO 00/37105). Los cebadores, específicos para el gen *phtD* solamente, se usaron para amplificar el gen *phtD* en dos fragmentos. Los cebadores portan los sitios de restricción *NdeI* y *KpnI* o *KpnI* y *XbaI*. Estos cebadores no hibridan con cualquier nucleótido del vector sino solamente con secuencias génicas específicas de *phtD*. Se insertó un codón de inicio ATG artificial usando el primer cebador que portaba el sitio de restricción *NdeI*.  
20 Los productos de PCR generados después se insertaron en el vector de clonación pGEM-T (Promega), y se confirmó la secuencia de ADN. Después se realizó la subclonación de los fragmentos en el vector de expresión TCMP 14 usando técnicas convencionales y el vector se transformó en AR58 *E. coli*.

#### Purificación de PhtD

La purificación de PhtD se consigue del siguiente modo:

25 Cultivo de células *E. coli* en presencia de kanamicina: cultivo de 30 horas a 30°C, después inducción durante 18 horas a 39,5°C

Rotura de las células de *E. coli* a partir del cultivo completo a DO ± 115 en presencia de EDTA 5 mM y PMSF 2 mM como inhibidores de proteasa: Rannie, 2 pases, 100 MPa (1000 bar).

30 Captura de antígeno y eliminación de los desechos celulares en cromatografía Streamline Q XL en modo de lecho expandido a temperatura ambiente (20°C); la columna se lava con NaCl 150 mM + Empigen al 0,25% pH 6,5 y se eluyó con NaCl 400 mM + Empigen al 0,25% en tampón fosfato potásico 25 mM pH 7,4.

Filtración en cartucho Sartobran 150 (0,45 + 0,2 µm)

35 Unión de antígeno en cromatografía Sepharose FF IMAC quelante de Zn<sup>++</sup> a pH 7,4 en presencia de imidazol 5 mM a 4°C; la columna se lava con Imidazol 5 mM y Empigen al 1% y se eluyó con imidazol 50 mM, ambas en tampón fosfato potásico 25 mM pH 8,0.

Cromatografía de intercambio aniónico débil en modo positivo en Fractogel EMD DEAE a pH 8,0 (fosfato potásico 25 mM) a 4°C; la columna se lava con NaCl 140 mM y se eluye a NaCl 200 mM mientras los contaminantes (proteínas y ADN) permanecen adsorbidos en el intercambiador.

Concentración y ultrafiltración con Na/fosfato K 2 mM pH 7,15 en una membrana de 50 kDa.

40 Filtración a esterilización de la masa purificada en un cartucho de filtración Millipak-20 de 0,2 µm.

#### Ejemplo 1c: Expresión de neumolisina

La neumolisina de neumococos se preparó y detoxificó como se describe en el documento WO2004/081515 y el documento WO2006/032499.

#### Ejemplo 2:

#### 45 Preparación de conjugados

Se conoce bien en la técnica cómo preparar polisacáridos de neumococos purificados. Para los propósitos de estos ejemplos, los polisacáridos se prepararon esencialmente como se describe en el documento EP072513 o por procedimientos muy relacionados. Antes de la conjugación, los polisacáridos pueden adaptarse en tamaño por microfluidización como se describe a continuación.

Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas para cada polisacárido. Éstas se dan en la Tabla 1. El polisacárido de tamaño ajustado (excepto para PS5, 6B y 23F) se disolvió en NaCl 2 M, NaCl 0,2 M o en agua para inyección (WFI). La concentración óptima de polisacárido se evaluó para todos los serotipos. Todos los serotipos excepto el serotipo 18C se conjugaron directamente a la proteína vehículo como se detalla a continuación. Se prepararon dos conjugados alternativos del serotipo 22F; uno conjugado directamente, uno a través de un enlazador ADH.

A partir de una solución madre a 100 mg/ml en acetonitrilo o solución de acetonitrilo/agua 50%/50%, se añadió CDAP (proporción CDAP/PS 0,5-1,5 mg/mg PS) a la solución de polisacárido. Después de 1,5 minutos, se añadió NaOH 0,2 M-0,3 M para obtener el pH de activación específico. La activación del polisacárido se realizó a este pH durante 3 minutos a 25°C. La proteína purificada (proteína D, PhtD, neumolisina o DT) (la cantidad depende de la proporción inicial PS/proteína vehículo) se añadió al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento se realizó al pH específico durante hasta 2 horas (dependiendo del serotipo) bajo regulación del pH. Para inactivar los grupos éster de cianato sin reaccionar, después se añadió una solución de glicina 2 M a la mezcla. El pH se ajustó al pH de inactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a 25°C y después durante una noche a 2-8°C con agitación lenta continua.

#### Preparación de 18C:

18C se unió a la proteína vehículo mediante un enlazador - dihidrazida de ácido adípico (ADH). El polisacárido serotipo 18C se microfluidizó antes de la conjugación.

#### **Derivatización de toxoide tetánico con EDAC**

Para la derivatización del toxoide tetánico, se diluyó TT purificado a 25 mg/ml en NaCl 0,2 M y se añadió el espaciador ADH para alcanzar una concentración final de 0,2 M. Cuando se completó la disolución del espaciador, el pH se ajustó a 6,2. Después se añadió EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida) hasta alcanzar una concentración final de 0,02 M y la mezcla se agitó durante 1 hora bajo regulación del pH. La reacción de condensación se detuvo aumentando el pH hasta 9,0 durante al menos 30 minutos a 25°C. El TT derivatizado después se diafiltró (membrana de 10 kDa de CO) para retirar el ADH y el reactivo EDAC residuales. La masa TT<sub>AH</sub> finalmente se filtró a esterilidad hasta la etapa de acoplamiento y se almacenó a -70°C.

#### **Acoplamiento químico de TT<sub>AH</sub> a PS 18C**

Los detalles de los parámetros de conjugación pueden encontrarse en la Tabla 1.

Se diluyeron 2 gramos of PS microfluidizado a la concentración definida en agua y se ajustaron a NaCl 2 M por adición de NaCl en polvo.

Se añadió solución de CDAP (100 mg/ml recién preparada en acetonitrilo/WFI 50/50 v/v) hasta alcanzar la proporción CDAP/PS apropiada.

El pH se elevó hasta el pH de activación 9,0 por la adición de NaOH 0,3 M y se estabilizó a este pH hasta la adición de TT<sub>AH</sub>.

Después de 3 minutos, se añadió el TT<sub>AH</sub> derivatizado (20 mg/ml en NaCl 0,2 M) hasta alcanzar una proporción TT<sub>AH</sub>/PS de 2; el pH se reguló al pH de acoplamiento 9,0. La solución se dejó una hora bajo regulación del pH.

Para la inactivación, se añadió una solución de glicina 2 M a la mezcla PS/TT<sub>AH</sub>/CDAP.

El pH se ajustó al pH de inactivación (pH 9,0).

La solución se agitó durante 30 min a 25°C, y después se dejó durante una noche a 2-8°C con agitación lenta continua.

#### Conjugado PS22F<sub>AH</sub>-PhtD

En un segundo procedimiento de conjugación para este sacárido (siendo el primero el procedimiento de conjugación directo de PS22-PhtD mostrado en la Tabla 1), 22F se unió a la proteína vehículo mediante un enlazador - dihidrazida de ácido adípico (ADH). El polisacárido serotipo 22F se microfluidizó antes de la conjugación.

#### **Derivatización de PS 22F**

La activación y acoplamiento se realizan a 25°C en agitación continua en un baño de agua de temperatura controlada. El PS22F microfluidizado se diluyó para obtener una concentración final de PS de 6 mg/ml en NaCl 0,2 M y la solución se ajustó a pH 6,05 ± 0,2 con HCl 0,1 N.

Se añadió solución de CDAP (100 mg/ml recién preparada en acetonitrilo/WFI, 50/50) hasta alcanzar la proporción CDAP/PS apropiada (1,5/1 p/p).

El pH se elevó hasta el pH de activación  $9,00 \pm 0,05$  por la adición de NaOH 0,5 M y se estabilizó a este pH hasta la adición de ADH.

Después de 3 minutos, se añadió ADH hasta alcanzar la proporción ADH/PS apropiada (8,9/1 p/p); el pH se reguló al pH de acoplamiento 9,0. La solución se dejó durante 1 hora bajo regulación del pH.

- 5 El derivado PS<sub>AH</sub> se concentró y diafiltró.

Acoplamiento

- 10 Se añadió PhtD a 10 mg/ml en NaCl 0,2 M al derivado PS22F<sub>AH</sub> para alcanzar una proporción PhtD/PS22F<sub>AH</sub> de 4/1 (p/p). El pH se ajustó a  $5,0 \pm 0,05$  con HCl. La solución de EDAC (20 mg/ml en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5) se añadió manualmente en 10 min (250  $\mu$ l/min) hasta alcanzar 1 mg de EDAC/mg de PS22F<sub>AH</sub>. La solución resultante se incubó durante 150 min. (aunque también se usaron 60 min.) a 25°C en agitación y regulación del pH. La solución se neutralizó por adición de Tris-HCl 1 M pH 7,5 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 min. a 25°C.

Antes de la elución en Sephacryl S400HR, el conjugado se aclaró usando un filtro Minisart de 5  $\mu$ m.

El conjugado resultante tiene una proporción PhtD/PS final de 4,1 (p/p), un contenido de PS libre por debajo del 1% y una antigenicidad ( $\alpha$ -PS/ $\alpha$ -PS) del 36,3% y una antigenicidad anti-PhtD del 7,4%.

- 15 Purificación de los conjugados:

- 20 Los conjugados se purificaron por filtración en gel usando una columna de filtración en gel Sephacryl S400HR equilibrada con NaCl 0,15 M (S500HR para 18C) para retirar las moléculas pequeñas (incluyendo DMAP) y el PS no conjugado y la proteína. En base a los diferentes tamaños moleculares de los componentes de reacción, los conjugados PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-neumolisina o PS-DT eluyen primero, seguidos de PS libre, después por PD libre o DT libre y finalmente DMAP y otras sales (NaCl, glicina). Las fracciones que contienen conjugados se detectan por UV<sub>280nm</sub>. Las fracciones se combinan de acuerdo con su K<sub>d</sub>, se filtran a esterilidad (0,22  $\mu$ m) y se almacenan a +2-8°C. Se determinaron las proporciones PS/proteína en las preparaciones de conjugado.

**Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de S. pneumoniae-proteína D/TT/DT/PhtD/Plv**

- 25 Cuando aparece "μfluid" en una cabecera de fila, indica que el sacárido se ajustó en tamaño por microfluidización antes de la conjugación. Los tamaños de los sacáridos después de la microfluidización se dan en la tabla 2.



Tabla 1 - Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados PS de *S. pneumoniae*-proteína D/TT/DT/PhitD/Ply

| Serotipo  | 1 $\mu$ fluid  | 4 $\mu$ fluid  | 5               | 6A              | 6B              | 7E $\mu$ fluid  |
|---|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Conc. PS (mg/ml)  | 2,5            | 2,5            | 7,1             | 5,0             | 5,0             | 5,0             |
| Disolución PS   | WFI            | WFI            | WFI             | NaCl 2.M        | NaCl 2.M        | NaCl 2.M        |
| Conc. PD (mg/ml)  | 10,0           | 10,0           | 5,0             | 5,0             | 5,0             | 10,0            |
| Proporción inicial PD:PS (p/p)  | 1,5/1          | 1,5/1          | 1/1             | 1/1             | 1,1/1           | 1,2/1           |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)   | 0,50           | 0,50           | 0,79            | 0,83            | 0,83            | 0,75            |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>   | 9,0/9,0/9,0    | 9,5/9,5/9,0    | 9,0/9,0/9,0     | 9,5/9,5/9,0     | 9,5/9,5/9,0     | 9,5/9,5/9,0     |
| Serotipo  | 9V $\mu$ fluid | 14 $\mu$ fluid | 18C $\mu$ fluid | 19A $\mu$ fluid | 19F $\mu$ fluid | 22E $\mu$ fluid |
| Conc. PS (mg/ml)  | 5,0            | 5,0            | 4,5             | 15,0            | 9,0             | 6,0             |
| Disolución PS   | NaCl 2.M       | NaCl 2.M       | NaCl 2.M        | NaCl 2.M        | NaCl 2.M        | NaCl 0,2.M      |
| Conc. Proteína vehículo (mg/ml)   | 10,0           | 10,0           | 20,0 (TT)       | 10,0 (Ply)      | 20,0 (DT)       | 10,0 (PhitD)    |
| Proporción inicial proteína vehículo:PS (p/p)   | 1,2/1          | 1,2/1          | 2/1             | 2,5/1           | 1,5/1           | 3/1             |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)   | 0,50           | 0,75           | 0,75            | 1,5             | 1,5             | 1,5             |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>   | 9,5/9,5/9,0    | 9,5/9,5/9,0    | 9,0/9,0/9,0     | 9,0/9,0/9,0     | 9,0/9,0/9,0     | 9,0/9,0/9,0     |
| Nota: pH <sub>a</sub> ,c,q corresponde al pH para la activación, acoplamiento e inactivación, respectivamente |                |                |                 |                 |                 |                 |

**Caracterización:**

Cada conjugado se caracterizó y cumplió las especificaciones descritas en la Tabla 2. El contenido de polisacárido ( $\mu\text{g/ml}$ ) se midió por el ensayo del resorcinol y el contenido de proteínas ( $\mu\text{g/ml}$ ) por el ensayo de Lowry. La proporción final PS/PD (p/p) se determinó por la proporción de las concentraciones.

5 **Contenido de polisacárido libre (%):**

El contenido de polisacárido libre de los conjugados mantenidos a 4°C o almacenados 7 días a 37°C se determinó en el sobrenadante obtenido después de incubación con anticuerpos contra  $\alpha$ -proteína vehículo y sulfato de amonio saturado, seguido de una centrifugación.

10 Se usó  $\alpha$ -PS/ $\alpha$ -PS ELISA para la cuantificación del polisacárido libre en el sobrenadante. También se controló la ausencia de conjugado por un  $\alpha$ -proteína vehículo/ $\alpha$ -PS ELISA.

**Antigenicidad:**

La antigenicidad sobre los mismos conjugados se analizó en un ELISA tipo sándwich en el que la captura y la detección de anticuerpos fueron  $\alpha$ -PS y  $\alpha$ -proteína respectivamente.

**Contenido de proteína libre (%):**

15 La proteína vehículo no conjugada puede separarse del conjugado durante la etapa de purificación. El contenido de proteína residual libre se determinó usando cromatografía por exclusión de tamaño (TSK 5000-PWXL) seguida de detección UV (214 nm). Las condiciones de elución permitieron separar la proteína vehículo libre y el conjugado. El contenido de proteína libre en las masas de conjugado se determinó después frente a una curva de calibrado (de 0 a 50  $\mu\text{g/ml}$  de proteína vehículo). La proteína vehículo libre en % se obtuvo del siguiente modo: % de vehículo libre = (vehículo libre ( $\mu\text{g/ml}$ ))/(concentración total de la proteína vehículo correspondiente medida por Lowry ( $\mu\text{g/ml}$ ) \* 100%).

**Estabilidad:**

La distribución del peso molecular ( $K_{av}$ ) y la estabilidad se midieron en filtración en gel HPLC-SEC (TSK 5000-PWXL) para conjugados mantenidos a 4°C y almacenados durante 7 días a 37°C.

25 La caracterización 10/11/13/14-valente se da en la Tabla 2 (véanse los comentarios más abajo).

Los conjugados de proteína pueden adsorberse en fosfato de aluminio y combinarse para formar la vacuna final.

**Conclusión:**

Se han producido conjugados inmunogénicos, que ya se ha demostrado que son componentes de una vacuna prometedora.

30

**Tabla 2 - características de los conjugados**

| Conjugados  | Tamaño PS (Dax10 <sup>3</sup> ) | Proporción vehículo/PS | PS libre (Elisa) | Vehículo libre | Antigenicidad PS (Elisa) | Tamaño conj. (kDa) |
|-------------|---------------------------------|------------------------|------------------|----------------|--------------------------|--------------------|
| PS1-PD      | 349- 382*                       | 1,5-1,6                | 1,0%-1,2%        | 3,9%-4,8%      | 87%-95%                  | 1499-1715          |
| PS4-PD      | 93-100*                         | 1,5-1,6                | 4,7-6,5%         | 3,2%-4,0%      | 90%-96%                  | 1303-1606          |
| PS5-PD***   | 367-443                         | 0,80                   | 8,7-11,2%        | 2,2%-3,8%      | 93%- 108%                | 1998-2352          |
| PS6A-PD     | 1100-1540                       | 0,61                   | 4,5%             | No realizado   | 45,9%                    | No realizado       |
| PS6B- PD*** | 1069-1391                       | 0,7-0,8                | 1,3-1,6%         | <2,0%          | 68%-75%                  | 4778-5235          |
| PS7F-PD     | 255-264*                        | 1,1-1,2                | <1%              | <1,4%          | 58%                      | 3907-4452          |
| PS9V-PD     | 258-280*                        | 1,3-1,5                | <1%              | <1,3%          | 67%-69%                  | 9073-9572          |
| PS14-PD     | 232-241*                        | 1,4                    | <1%              | <1,5%          | 70%                      | 3430-3779          |
| PS18C-TT    | 89-97*                          | 2,2-2,4                | 1,5-2,2%         | <4%            | 46%-56%                  | 5464-6133          |
| PS19A-Ply*  | 151                             | 3,2                    | <1%              |                | 29%                      |                    |

(continuación)

| Conjugados    | Tamaño PS (Dax10 <sup>3</sup> ) | Proporción vehículo/PS | PS libre (Elisa) | Vehículo libre | Antigenicidad PS (Elisa) | Tamaño conj. (kDa) |
|---------------|---------------------------------|------------------------|------------------|----------------|--------------------------|--------------------|
| PS19F-DT      | 133-143*                        | 1,4-1,5                | 4,1%-5,9%        | <1,2%-<1,3%    | 82%-88%                  | 2059-2335          |
| PS22F-PhtD*   | 159-167                         | 2,17                   | 5,8              | No realizado   | 37%                      | No realizado       |
| PS22F-AHPhtD* | 159-167                         | 3,66-4,34              | <1%              | No realizado   | 28-31%                   | No realizado       |
| PS23F-PD***   | 914-980                         | 0,5                    | 1,4-1,9%         | 3,7%-4,9%      | 137%-154%                | 2933-3152          |

\* Tamaño de PS después de microfluidización del PS nativo

Se preparó una vacuna 10 valente mezclando los conjugados de serotipo 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (por ejemplo, a una dosis de 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 µg de sacárido, respectivamente por dosis humana). Se preparó una vacuna 11 valente añadiendo adicionalmente el conjugado de serotipo 3 de la Tabla 5 (por ejemplo, a 1 µg de sacárido por dosis humana). Se preparó una vacuna 13 valente añadiendo adicionalmente los conjugados de serotipos 19A y 22F anteriores (con 22F unido directamente a PhtD, o como alternativa a través de un enlazador ADH) [por ejemplo a una dosis de 3 µg cada sacárido por dosis humana]. Puede prepararse una vacuna 14 valente añadiendo adicionalmente el conjugado de serotipo 6A anterior [por ejemplo a una dosis de 1 µg de sacárido por dosis humana].

### Ejemplo 3: Evidencia de que la inclusión de la proteína D de *Haemophilus influenzae* en una composición inmunogénica de la invención puede proporcionar protección mejorada con la otitis media aguda (AOM).

Diseño del estudio.

El estudio usó una vacuna 11Pn-PD - que comprende los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F cada uno conjugado con la proteína D de *H. influenzae* (hágase referencia a la Tabla 5 del Ejemplo 4). Los sujetos se asignaron aleatoriamente en dos grupos para recibir cuatro dosis de la vacuna 11Pn-PD o *Havrix* a aproximadamente los 3, 4, 5 y 12-15 meses de edad. Todos los sujetos recibieron la vacuna *Infanrix-hexa* (DTPa-HBV-IPV/Hib) de GSK Biologicals de forma concomitante a los 3, 4 y 5 meses de edad. *Infanrix-hexa* es una combinación de *Pediarix* y Hib mezcladas antes de la administración. El seguimiento de la eficacia para el análisis "de acuerdo con el protocolo" comenzó 2 semanas después de la administración de la tercera dosis de vacuna y continuó hasta los 24-27 meses de edad. Se evaluó el transporte nasofaríngeo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en un subconjunto seleccionado de sujetos. Se aconsejó a los padres consultar al investigador si su niño se ponía enfermo, tenía dolor en los oídos, perforación espontánea de la membrana timpánica o secreción espontánea en el oído. Si el investigador sospechaba de un episodio de AOM, el niño se remitía inmediatamente a un especialista otorrinolaringólogo para la confirmación del diagnóstico. Un diagnóstico clínico de AOM se basó en el aspecto visual de la membrana timpánica (es decir rojez, abultamiento, pérdida de reflejos pupilares) o la presencia de efusión de fluido en el oído medio (como se demuestra por otoscopia simple o neumática o por microscopía). Además, tenían que estar presentes al menos dos de los siguientes signos o síntomas: dolor de oído, secreción en el oído, pérdida auditiva, fiebre, apatía, irritabilidad, anorexia, vómitos, o diarrea. Si el especialista otorrinolaringólogo confirmaba el diagnóstico clínico, se recogía una muestra del fluido del oído medio por timpanocentesis para en ensayo bacteriológico. Para sujetos con visitas repetidas por enfermedad, se consideraba que empezaba un nuevo episodio de AOM si habían pasado más de 30 días desde el inicio del episodio previo. Además, se consideró que un episodio AOM era un nuevo episodio bacteriano si la bacteria/serotipo aislado difería del aislado previo independientemente del intervalo entre los dos episodios consecutivos.

#### Resultados del ensayo

Se admitió a un total de 4968 bebés, 2489 en el grupo 11Pn-PD y 2479 en el grupo de control. No hubo diferencias mayoritarias en las características demográficas o factores de riesgo entre los dos grupos.

#### Episodios clínicos y definición de caso AOM

Durante el periodo de seguimiento por protocolo, se registró un total de 333 episodios de AOM clínica en el grupo 11Pn-PD y 499 en el grupo de control.

La Tabla 3 presenta la eficacia protectora de la vacuna 11Pn-PD y las dos vacunas 7-valentes previamente ensayadas en Finlandia (Eskola y col. N Engl J Med 2001; 344: 403 - 409 y Kilpi y col. Clin Infect Dis 2003 37:1155-64) contra cualquier episodio de AOM y AOM causada por diferentes serotipos de neumococos, *H. influenzae*, *NTHi* y *M. catarrhalis*. Se consiguió una reducción estadísticamente significativa y clínicamente relevante del 33,6% de la carga de enfermedad AOM global con 11Pn-PD, independientemente de la etiología (tabla 3).

La eficacia global contra episodios AOM debido a cualquiera de los 11 serotipos de neumococos contenidos en la vacuna 11Pn-PD fue del 57,6% (tabla 3).

5 Otro hallazgo importante en el actual estudio es la protección del 35,6% proporcionada por la vacuna 11Pn-PD contra AOM causada por *H. influenzae* (y específicamente la protección del 35,3% proporcionada por NTHi). Este descubrimiento es de gran importancia clínica, dada la importancia aumentada de *H. influenzae* como causa principal de AOM en la edad de la vacuna de conjugado de neumococos. En línea con la protección proporcionada contra AOM, la vacuna 11 Pn-PD también reducía el transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* después de la dosis de refuerzo en el segundo año de vida. Estos hallazgos están en contraste con las observaciones precisas en Finlandia donde, para las dos vacunas de conjugado de neumococos 7-valentes, se observaba un aumento en los episodios AOM debido a *H. influenzae* (Eskola y col. y Kilpi y col.) como evidencia de remplazo etiológico.

10 No pudo establecerse una clara correlación entre protección contra episodios AOM debidos a Hi y los niveles de anticuerpos contra la proteína D vehículo, ya que las concentraciones de anticuerpos IgG anti-PD post-primarias en vacunados 11 Pn-PD, que permanecían sin episodios Hi AOM, eran esencialmente iguales que los niveles de anticuerpos IgG anti-PD post-primarios medidos en vacunados 11 Pn-PD que desarrollaron al menos un episodio Hi AOM durante el periodo de seguimiento de la eficacia. Sin embargo, aunque no pudo establecerse correlación entre el impacto biológico de la vacuna y la inmunogenicidad IgG anti-PD post-primaria, es razonable asumir que la proteína vehículo PD, que está altamente conservada entre las cepas de *H. influenzae*, ha contribuido en gran medida a la inducción de la protección contra Hi.

15 El efecto sobre la enfermedad AOM estuvo acompañado por un efecto sobre el transporte nasofaríngeo que fue de magnitud similar para los neumococos del serotipo de la vacuna y *H. influenzae* (Figura 1). Esta reducción del transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* en los vacunas con conjugado PD apoya la hipótesis de un efecto protector directo de la vacuna de conjugado PD contra *H. influenzae*, incluso si la eficacia protectora pudiera no estar correlacionada con las respuestas inmunes IgG anti-PD medidas por ELISA.

20 En el siguiente experimento se usó un modelo de chinchilla de otitis media con combinaciones séricas de bebés inmunizados con la formulación 11 valente de este ejemplo o con la vacuna 10 valente del Ejemplo 2 (véase también la Tabla 1 y 2 y los comentarios más abajo). Ambas combinaciones inducen una reducción significativa del porcentaje de animales con otitis media frente a la combinación sérica pre-inmune. No existes diferencias significativas entre las combinaciones inmunes 10 y 11 valentes. Esto demuestra que ambas vacunas tienen un potencial similar para inducir protección contra la otitis media causada por *H. influenzae* no tipificable en este modelo.

25

30

Tabla 3

| Tipo de episodio AOM  | 11Pn-PD |         |      | Prevnar en FinOM (Eaola y co) |        |         | 7v-OMP en FinOM (MIP y co) |      |         |     |
|---|---------|---------|------|-------------------------------|--------|---------|----------------------------|------|---------|-----|
|   | n       | Control | %    | n                             | 7v-CRM | Control | %                          | n    | Control | %   |
|   |         |         |      |                               |        |         |                            |      |         |     |
| N   | 2455    | 2452    |      | 786                           | 794    |         |                            | 805  | 794     |     |
| Cualquier AOM   | 333     | 499     | 33,6 | 1251                          | 1345   | 6       | -4                         | 1364 | 1345    | -1  |
| Cualquier AOM con MEF   | 322     | 474     | 32,4 | 1177                          | 1267   | 7       | -5                         | 1279 | 1267    | 0   |
| Neumococos confirmados por cultivo  | 92      | 189     | 51,5 | 271                           | 414    | 34      | 21                         | 45   | 414     | 25  |
| Serotipos de neumococos de vacuna(*)  | 60      | 141     | 57,6 | 107                           | 250    | 57      | 44                         | 67   | 250     | 56  |
| Otros patógenos bacterianos   |         |         |      |                               |        |         |                            |      |         |     |
| <i>H. influenzae</i>  | 44      | 68      | 35,6 | 315                           | 287    | -11     | -34                        | 8    | 315     | 287 |
| <i>H. influenzae</i> no tipificable (NTHi)  | 41      | 63      | 35,3 | NP                            | NP     | NP      | NP                         | NP   | NP      | NP  |
| <i>M. catarrhalis</i>   | 31      | 34      | 9,4  | 379                           | 381    | -1      | -19                        | 15   | 444     | 381 |
| NP = No publicado; N = número de sujetos en la cohorte de eficacia ATP; n = número de episodios                                     |         |         |      |                               |        |         |                            |      |         |     |
| *Serotipos de neumococos de vacuna: para 11 Pn-PD = 11 serotipos, para Prevnar y 7v-OMP = 7 serotipos MEF = fluido en el oído medio |         |         |      |                               |        |         |                            |      |         |     |

**Ejemplo 4:****Selección de proteína vehículo para el serotipo 19F**

Ensayo ELISA usado

5 El procedimiento de ELISA de inhibición de 22F se basó esencialmente en un ensayo propuesto en 2001 por Concepcion y Frasch y se presentó por Henckaerts y col., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360. En resumen, se mezclaron polisacáridos de neumococos purificados con albúmina sérica humana metilada y se adsorbieron en placas de microtitulación de alta unión Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) durante una noche a 4°C. Las placas se bloquearon con suero bovino fetal (FBS) al 10% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las muestras séricas se diluyeron en PBS que contenía FBS al 10%, 10 µg/ml de polisacárido de pared celular (SSI) y 2 µg/ml de polisacárido de neumococos de serotipo 22F (ATCC), y se diluyeron adicionalmente en las placas de microtitulación con el mismo tampón. Se trató una referencia interna calibrada frente al 89-SF sérico convencional usando las concentraciones de IgG específica de serotipo en 89-SF del mismo modo y se incluyó en cada placa. Después del lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) diluido en FBS al 10% (en PBS), y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El color se desarrolló usando el kit de sustrato del inmunoensayo de enzima peroxidasa con tetrametilbenzidina de un único componente listo para su uso (BioRad, Hercules, CA, US) en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 M, y la densidad óptica se leyó a 450 nm. Las concentraciones de IgG específica de serotipo (en µg/ml) en las muestras se calcularon refiriendo los puntos de densidad óptica dentro de los límites definidos a la curva sérica de la referencia interna, que se modeló por una ecuación logarítmica lógica de 4 parámetros calculada con el software SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El punto de corte para el ELISA fue de 0,05 µg/ml de IgG para todos los serotipos teniendo en cuenta el límite de detección y el límite de cuantificación.

Ensayo de opsonofagocitosis

25 En la reunión de consulta de la OMS en junio de 2003, se recomendó usar un ensayo OPA que es expone en Romero-Steiner y col. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 10 (6): pág.1019-1024. Este protocolo se usó para ensayar la actividad OPA de los serotipos en los siguientes ensayos.

**Preparación de conjugados**

30 En los estudios, se incluyeron 11 Pn-PD&Di-001 y 11 Pn-PD&Di-007, tres formulaciones de vacuna 11-valentes (Tabla 4) en las que se conjugaron 3 µg del polisacárido 19F al toxoide diftérico (19F-DT) en lugar de 1 µg de polisacárido conjugado a proteína D (19F-PD). Los parámetros de conjugación para los estudios de 11Pn-PD, 11 Pn-PD&Di-001 y 11 Pn-PD&Di-007 se describen en las Tablas 5, 6 y 7 respectivamente.

Las respuestas de anticuerpos anti-neumococos y la actividad OPA contra el serotipo 19F un mes después de la vacunación primaria con estas formulaciones 19F-DT se muestran en la Tabla 8 y 9 respectivamente.

35 La Tabla 10 muestra las concentraciones de anticuerpos 22F-ELISA y los porcentajes de sujetos que alcanzaban el umbral de 0,2 µg/ml antes y después de la vacunación de refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente.

40 Se demostró que la actividad opsonofagocítica estaba claramente mejorada para anticuerpos inducidos con estas formulaciones 19F-DT como se demuestra por las mayores tasas de seropositividad (títulos opsonofagocíticos ≥1:8) y GMT OPA un mes después de la vacunación primaria (Tabla 9). Un mes después de la vacunación de refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente, la actividad opsonofagocítica de anticuerpos 19F seguía siendo significativamente mejor para niños sensibilizados con formulaciones 19F-DT (Tabla 11).

45 La Tabla 12 presenta los datos de inmunogenicidad después de una dosis de refuerzo de 11Pn-PD en niños previamente sensibilizados con conjugados 19F-DT o 19F-PD en comparación con una 4ª dosis consecutiva de *Prevnar*®. Dados los casos avanzados presentados después de la introducción de *Prevnar*® en los Estados Unidos, la actividad opsonofagocítica mejorada contra el serotipo 19F cuando se conjuga con la proteína vehículo DT puede ser una ventaja para la vacuna candidata.

La Tabla 13 proporciona los datos ELISA y OPA para el conjugado 19F-DT con respecto al serotipo 19A de reactividad cruzada. Se descubrió que 19F-DT induce una baja actividad OPA aunque significativa contra 19A.

**Tabla 4 Formulaciones de vacuna de conjugados de neumococos usadas en estudios clínicos.**

| Formulación    | Serotipo de neumococos µg/proteína vehículo |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      | Al <sup>3+</sup> mg |
|----------------|---|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|---------------------|
|                | 1   | 3    | 4    | 5    | 6B    | 7E   | 9V   | 14   | 18C  | 19F  | 23F  |                     |
| 11Ph-PD        | 1/PD  | 1/PD | 1/PD | 1/PD | 1/PD  | 1/PD | 1/PD | 1/PD | 1/PD | 1/PD | 1/PD | < 0,8               |
| 19F-DT Forma 1 | 3/PD  | 3/PD | 3/PD | 3/PD | 10/DT | 3/PD | 3/PD | 3/PD | 3/PD | 3/DT | 5/DT | ≤ 0,35              |
| 19F-DT Forma 2 | 3/PD  | 2/PD | 2/PD | 3/PD | 5/DT  | 3/PD | 2/PD | 2/PD | 2/PD | 3/DT | 5/DT | ≤ 0,35              |
| 19F-DT Forma 3 | 3/PD  | 3/PD | 3/PD | 3/PD | 3/PD  | 3/PD | 3/PD | 3/PD | 3/PD | 3/DT | 3/PD | = 0,5               |

**Tabla 5 Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de S. pneumoniae-proteína D/TT/DT**

| Serotipo  | 1 Nativo    | 3 µfluid    | 3 Nativo    | 4 Nativo    | 6B Nativo   | 7F Nativo   |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Conc. PS (mg/ ml)                                 | 1,5         | 2           | 2,0         | 7,5         | 5,5         | 3,0         |
| Disolución PS                                     | NaCl 150 mM | NaCl 2 M    | WFI         | WFI         | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    |
| Conc. PD (mg/ml)                                  | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 5,0         |
| Proporción inicial PS/PD (p/p)                    | 1/0,7       | 1/1         | 1/1         | 1/1         | 1/1         | 1/1         |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)                             | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75        |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub> | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0 | 8,8/8,8/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0 | 9,0/9,0/9,0 |
| Tiempo de acoplamiento                            | 60 min.     | 60 min.     | 45 min.     | 40 min.     | 60 min.     | 60 min.     |

| Serotipo  | 9V Nativo   | 14 Nativo   | 18C Nativo  | 19F Nativo  | 23F Nativo  |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Conc. PS (mg/ ml)                                 | 1,75        | 2,5         | 1,75        | 4,0         | 2,5         |
| Disolución PS                                     | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    | WFI         | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    |
| Conc. PD (mg/ml)                                  | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 5,0         |
| Proporción inicial PS/PD (p/p)                    | 1/0,75      | 1/0,75      | 1/1,2       | 1/1         | 1/1         |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)                             | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75        |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub> | 8,5/8,5/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0 | 9,5/9,5/9,0 |
| Tiempo de acoplamiento                            | 60 min.     | 60 min.     | 45 min.     | 30 min.     | 60 min.     |

5 **Tabla 6 Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de S. pneumoniae-proteína D/DT para el estudio 11 Pn-PD&Di-001**

| Serotipo  | 1 µfluid    | 3 µfluid    | 4 µfluid    | 5 µfluid     | 6B µfluid       | 7F Nativo |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|-----------|
| Conc. PS (mg/ml)                                  | 4           | 2,0         | 2,5         | 7,5          | 10              | 3,0       |
| Disolución PS                                     | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    | NaCl 2 M     | NaCl 2 M        | NaCl 2 M  |
| Conc. PD (mg/ml)                                  | 10,0        | 5,0         | 5,0         | 5,0 NaCl 2 M | 20(DT) NaCl 2 M | 5,0       |
| Proporción inicial PS/PD (p/p)                    | 1,2/1       | 1/1         | 1/1         | 1/1          | 1,5/1           | 1/1       |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)                             | 1,50        | 0,75        | 1,5         | 2            | 1,5             | 0,75      |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub> | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0 | 9,5/9,5/9,0 | 9,0/9,0/9,0  | 9,5/9,5/9,0     | 9/9/9     |



(continuación)

|   |             |             |             |             |             |           |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| Serotipo  | 1 µfluid    | 3 µfluid    | 4 µfluid    | 5 µfluid    | 6B µfluid   | 7F Nativo |
| Tiempo de acoplamiento                            | 60 min.     | 60 min.     | 60 min.     | 60 min.     | 60 min.     | 60 min.   |
| Serotipo  | 9V Nativo   | 14 Nativo   | 18C µfluid  | 19F µfluid  | 23F µfluid  |           |
| Conc. PS (mg/ml)                                  | 1,75        | 2,5         | 5,0         | 9,0         | 10          |           |
| Disolución PS                                     | NaCl 2M     | NaCl 2M     | NaCl 2M     | NaCl 2M     | NaCl 2M     |           |
| Conc. PD (mg/ml)                                  | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 20 (DT)     | 10 (DT)     |           |
| Proporción inicial PS/PD (p/p)                    | 0,75/1      | 0,75/1      | 1,2/1       | 1,5/1       | 1,5/1       |           |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)                             | 0,75        | 0,75        | 1,5         | 1,5         | 0,75        |           |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub> | 8,5/8,5/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0 |           |
| Tiempo de acoplamiento                            | 60 min.     | 60 min.     | 60 min.     | 60 min.     | 60 min.     |           |

**Tabla 7 Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de *S. pneumoniae*-proteína D/DT para el estudio 11 Pn-PD&Di-007**

|   |             |             |             |             |             |            |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Serotipo  | 1 Nativo    | 3 µfluid    | 4 Nativo    | 5 Nativo    | 6B Nativo   | 7F µfluid  |
| Conc. PS (mg/ml)                                  | 1,5         | 2,0         | 2           | 7,5         | 5,5         | 5,0        |
| Disolución PS                                     | NaCl 150 mM | NaCl 2 M    | WFI         | WFI         | NaCl 2 M    | NaCl 2 M   |
| Conc. PD (mg/ml)                                  | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 5,0         | 5           | 10         |
| Proporción inicial PS/PD (p/p)                    | 0,7/1       | 1/1         | 1           | 1/1         | 1/1         | 1,2/1      |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)                             | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75        | 0,75       |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub> | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0 | 8,8/8,8/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0 | 9,5,9,5/9  |
| Tiempo de acoplamiento                            | 60 min.     | 60 min.     | 45 min.     | 40 min.     | 60 min.     | 60 min.    |
| Serotipo  | 9V µfluid   | 14 µfluid   | 18C µfluid  | 19F µfluid  | 19F µfluid  | 23F µfluid |
| Conc. PS (mg/ml)                                  | 5,0         | 5,0         | 1,75        | 9,0         | 10,0        | 9,5        |
| Disolución PS                                     | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    | WFI         | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    | NaCl 2 M   |
| Conc. PD (mg/ml)                                  | 10          | 10,0        | 5,0         | 20 (DT)     | 5,0 (DT)    | 10         |

(continuación)

| Serotipo  | 1 Nativo    | 3 $\mu$ fluid | 4 Nativo    | 5 Nativo    | 6B Nativo   | 7F $\mu$ fluid |
|---|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Proporción inicial PS/PD (p/p)                    | 1,2/1       | 1,2/1         | 1,2/1       | 1,5/1       | 1,2/1       | 1/1            |
| Conc. CDAP (mg/mg PS)                             | 0,5         | 0,75          | 0,75        | 1,5         | 0,75        | 0,75           |
| pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub> | 9,5/9,5/9,0 | 9,5/9,5/9,0   | 9,0/9,0/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,0/9,0/9,0 | 9,5/9,5/9,0    |
| Tiempo de acoplamiento                            | 60 min.     | 60 min.       | 45 min.     | 120 min.    | 120 min.    | 60 min.        |

**Tabla 8 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos 19F  $\geq$  0,20  $\mu$ g/ml y concentraciones medias geométricas de anticuerpos 19F (GMC con 95% CI;  $\mu$ g/ml) un mes después de vacunación primaria con 1  $\mu$ g de 19F-PD, 3  $\mu$ g de 19F-DT o *Prevnar* (2  $\mu$ g de 19F-CRM) (cohorte total)**

5

| Grupo                       | 11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA) |                                      |                               | 11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA) |                                      |                               |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
|                             | N                          | % $\geq$ 0,20 $\mu$ g/ml<br>(95% CI) | GMC ( $\mu$ g/ml)<br>(95% CI) | N                          | % $\geq$ 0,20 $\mu$ g/ml<br>(95% CI) | GMC ( $\mu$ g/ml)<br>(95% CI) |
| 11Pn-PD                     | 152                        | <b>98,7</b><br>(95,3-99,8)           | <b>1,93</b><br>(1,67-2,22)    | 50                         | <b>100</b><br>(92,9-100)             | <b>2,78</b><br>(2,31-3,36)    |
| 19F-DT Forma 1 <sup>†</sup> | 146                        | <b>99,3</b><br>(96,2-100)            | <b>2,88</b><br>(2,45-3,38)    | -                          | -                                    | -                             |
| 19F-DT Forma 2 <sup>†</sup> | 150                        | <b>96,0</b><br>(91,5-98,5)           | <b>2,43</b><br>(2,01-2,94)    | -                          | -                                    | -                             |
| 19F-DT Forma 3 <sup>†</sup> | -                          | -                                    | -                             | 50                         | <b>96,0</b><br>(86,3-99,5)           | <b>3,70</b><br>(2,58-5,30)    |
| <i>Prevnar</i>              | 148                        | <b>98,6</b><br>(95,2-99,8)           | <b>2,98</b><br>(2,60-3,41)    | 41                         | <b>97,6</b><br>(87,1-99,9)           | <b>2,91</b><br>(2,15-3,94)    |

<sup>†</sup>La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

**Tabla 9 Porcentaje de sujetos con un título OPA 19F  $\geq$  1:8 y GMT de OPA 19F un mes después de la vacunación primaria con 1  $\mu$ g de 19F-PD, 3  $\mu$ g de 19F-DT o *Prevnar* (2  $\mu$ g de 19F-CRM) (cohorte total)**

| Grupo                       | 11Pn-PD&Di-001 |                            |                               | 11Pn-PD&Di-007 |                            |                               |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|-------------------------------|----------------|----------------------------|-------------------------------|
|                             | N              | $\geq$ 1:8 (95% CI)        | GMT (95% CI)                  | N              | $\geq$ 1:8 (95% CI)        | GMT (95% CI)                  |
| 11Pn-PD                     | 136            | <b>84,6</b><br>(77,4-90,2) | <b>77,8</b><br>(58,1-104,4)   | 46             | <b>95,7</b><br>(85,2-99,5) | <b>167,8</b><br>(118,1-238,6) |
| 19F-DT Forma 1 <sup>†</sup> | 137            | <b>95,6</b><br>(90,7-98,4) | <b>263,2</b><br>(209,4-330,7) | -              | -                          | -                             |
| 19F-DT Forma 2 <sup>†</sup> | 139            | <b>92,1</b><br>(86,3-96,0) | <b>218,9</b><br>(166,5-287,9) | -              | -                          | -                             |

(continuación)

| Grupo                       | 11Pn-PD&Di-001 |                            |                             | 11Pn-PD&Di.007 |                            |                               |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|----------------------------|-------------------------------|
|                             | N              | ≥1:8 (95% CI)              | GMT (95% CI)                | N              | ≥1:8 (95% CI)              | GMT (95% CI)                  |
| 19F-DT Forma 3 <sup>†</sup> | -              | -                          | -                           | 49             | <b>91,8</b><br>(80,4-97,7) | <b>403,1</b><br>(225,7-719,9) |
| <i>Pprevnar</i>             | 131            | <b>86,3</b><br>(79,2-91,6) | <b>82,6</b><br>(61,1-111,6) | 38             | <b>81,6</b><br>(65,7-92,3) | <b>65,0</b><br>(37,7-112,2)   |

<sup>†</sup>La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

**Tabla 10 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpo 19F ≥ 0,20 µg/ml y GMC de anticuerpo 19F (µg/ml) antes de y un mes después del refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente en niños sensibilizados con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o *Pprevnar* (2 µg de 19F-CRM) (cohorte total)**

5

| Grupo primario              | 11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)         |                            |                            |   |                            |                               |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---|----------------------------|-------------------------------|
|                             | Antes de la vacunación de refuerzo |                            |                            | Un mes después del refuerzo PS 23-valente |                            |                               |
|                             | N                                  | % ≥ 0,20 µg/ml<br>(95% CI) | GMC (µg/ ml)<br>(95% CI)   | N   | % ≥ 0,20 µg/ml<br>(95% CI) | GMC (µg/ ml)<br>(95% CI)      |
| 11Pn-PD                     | 70                                 | <b>77,1</b><br>(65,6-86,3) | <b>0,67</b><br>(0,45-0,98) | 67  | <b>94,0</b><br>(85,4-98,3) | <b>11,50</b><br>(7,76-17,03)  |
| 19F-DT Forma 1 <sup>†</sup> | 68                                 | <b>91,2</b><br>(81,8-96,7) | <b>0,71</b><br>(0,54-0,94) | 69  | <b>98,6</b><br>(92,2-100)  | <b>14,50</b><br>(10,47-20,07) |
| 19F-DT Forma 2 <sup>†</sup> | 74                                 | <b>81,1</b><br>(70,3-89,3) | <b>0,59</b><br>(0,43-0,80) | 72  | <b>95,8</b><br>(88,3-99,1) | <b>9,90</b><br>(6,74-14,54)   |
| <i>Pprevnar</i>             | 65                                 | <b>64,6</b><br>(51,8-76,1) | <b>0,40</b><br>(0,27-0,60) | 67  | <b>100</b><br>(94,6-100)   | <b>9,40</b><br>(6,95-12,71)   |

<sup>†</sup>La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

**Tabla 11 Porcentaje de sujetos con un título OPA 19F ≥ 1:8 y GMT de OPA 19F antes de y un mes después del refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente en niños sensibilizados con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o *Pprevnar* (2 µg de 19F-CRM) (cohorte total)**

| Grupo primario              | 11Pn-PD&Di-002                     |                            |                           |   |                            |                                 |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---|----------------------------|---------------------------------|
|                             | Antes de la vacunación de refuerzo |                            |                           | Un mes después del refuerzo PS 23-valente |                            |                                 |
|                             | N                                  | ≥1:8 (95% CI)              | GMT (95% CI)              | N   | ≥1:8 (95% CI)              | GMT (95% CI)                    |
| 11Pn-PD                     | 29                                 | <b>27,6</b><br>(12,7-47,2) | <b>10,9</b><br>(5,0-23,7) | 28  | <b>82,1</b><br>(63,1-93,9) | <b>408,0</b><br>(157,3-1058,3)  |
| 19F-DT Forma 1 <sup>†</sup> | 19                                 | <b>47,4</b><br>(24,4-71,1) | <b>18,1</b><br>(7,2-45,7) | 18  | <b>94,4</b><br>(72,7-99,9) | <b>1063,8</b><br>(386,6-2927,5) |
| 19F-DT Forma 2 <sup>†</sup> | 27                                 | <b>33,3</b><br>(16,5-54,0) | <b>8,5</b><br>(4,7-15,3)  | 28  | <b>100</b><br>(87,7-100)   | <b>957,6</b><br>(552,8-1659,0)  |

10

(continuación)

| Grupo primario | 11Pn-PD&Di-002                     |                           |                          |   |                            |                                |
|----------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---|----------------------------|--------------------------------|
|                | Antes de la vacunación de refuerzo |                           |                          | Un mes después del refuerzo PS 23-valente |                            |                                |
|                | N                                  | ≥1:8 (95% CI)             | GMC (95% CI)             | N   | ≥1:8 (95% CI)              | GMC (95% CI)                   |
| <i>Prevnar</i> | 24                                 | <b>12,5</b><br>(2,7-32,4) | <b>8,1</b><br>(3,4-19,6) | 23  | <b>82,6</b><br>(61,2-95,0) | <b>380,9</b><br>(133,2-1089,5) |

<sup>†</sup>La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

5

**Tabla 12 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos ≥ 0,20 µg/ml, OPA ≥1:8 y GMC/GMT contra neumococos 19F un mes después de refuerzo con 11Pn-PD o Pevnar en niños sensibilizados con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o Pevnar (2 µg de 19F-CRM) (cohorte total)**

| Grupo primario              | 11Pn-PD&Di-002   |                            |                          |            |                            |                               |
|-----------------------------|------------------|----------------------------|--------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------|
|                             | Ensayo 22F-ELISA |                            |                          | Ensayo OPA |                            |                               |
|                             | N                | % ≥ 0,20 µg/ml<br>(95% CI) | GMC (µg/ ml)<br>(95% CI) | N          | ≥1:8 (95% CI)              | GMC (95% CI)                  |
| 11Pn-PD                     | 70               | <b>100</b><br>(94,9-100)   | <b>4,52</b><br>(3,7-5,5) | 21         | <b>100</b><br>(83,9-100)   | <b>255,6</b><br>(135,5-481,9) |
| 19F-DT Forma 1 <sup>†</sup> | 66               | <b>98,5</b><br>(91,8-100)  | <b>3,45</b><br>(2,8-4,3) | 23         | <b>95,7</b><br>(78,1-99,9) | <b>374,0</b><br>(192,6-726,2) |
| 19F-DT Forma 2 <sup>†</sup> | 70               | <b>98,6</b><br>(92,3-100)  | <b>3,80</b><br>(2,9-4,9) | 29         | <b>96,6</b><br>(82,2-99,9) | <b>249,1</b><br>(144,7-428,7) |
| <i>Pevnar</i>               | 69               | <b>97,1</b><br>(89,9-99,6) | <b>2,56</b><br>(2,0-3,3) | 31         | <b>96,8</b><br>(83,3-99,9) | <b>528,7</b><br>(319,4-875,2) |

<sup>†</sup>La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

**Tabla 13 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos ≥ 0,20 µg/ml, Opt ≥1:8 y GMC/GMT contra neumococos 19A un mes después de vacuna primaria con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o Pevnar (2 µg de 19F-CRM) (cohorte total)**

| Grupo                       | 11Pn-PD&Di-001   |                            |                            |            |                            |                           |
|-----------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|------------|----------------------------|---------------------------|
|                             | Ensayo 22F-ELISA |                            |                            | Ensayo OPA |                            |                           |
|                             | N                | % ≥ 0,20 µg/ml<br>(95% CI) | GMC (µg/ ml)<br>(95% CI)   | N          | ≥1:8 (95% CI)              | GMC (95% CI)              |
| 11Pn-PD                     | 45               | <b>28,9</b><br>(16,4-44,3) | <b>0,09</b><br>(0,07-0,11) | 52         | <b>7,7</b> (2,1-18,5)      | <b>5,2</b> (4,0-6,8)      |
| 19F-DT Forma 2 <sup>†</sup> | 51               | <b>29,4</b><br>(17,5-43,8) | <b>0,11</b><br>(0,08-0,16) | 59         | <b>27,1</b><br>(16,4-40,3) | <b>12,4</b><br>(7,6-20,3) |

10

(continuación)

| Grupo          | 11Pn-PD&Di-001   |                            |                            |            |                       |                      |
|----------------|------------------|----------------------------|----------------------------|------------|-----------------------|----------------------|
|                | Ensayo 22F-ELISA |                            |                            | Ensayo OPA |                       |                      |
|                | N                | % ≥ 0,20 µg/ml<br>(95% CI) | GMC (µg/ ml)<br>(95% CI)   | N          | ≥1:8 (95% CI)         | GMT (95% CI)         |
| <i>Prevnar</i> | 55               | <b>18,2</b><br>(9,1-30,9)  | <b>0,10</b><br>(0,08-0,12) | 61         | <b>3,3</b> (0,4-11,3) | <b>4,6</b> (3,8-5,6) |

<sup>†</sup>La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

**Ejemplo 5: Experimentos de adyuvantes en modelos preclínicos: impacto sobre la inmunogenicidad de conjugados de polisacáridos 11-valentes de neumococos en monos rhesus viejos**

5 Para optimizar la respuesta provocada contra las vacunas de neumococos de conjugado en la población anciana, GSK formuló una vacuna de conjugado de polisacárido (PS) 11-valente con un nuevo adyuvante C - véase a continuación.

10 Se inmunizaron grupos de 5 monos rhesus viejos (de 14 a 28 años de edad) por vía intramuscular (IM) en los días 0 y 28 con 500 µl de conjugados PS 11-valentes adsorbidos en 315 µg de AlPO4 o conjugados PS 11-valentes mezclados con adyuvante C.

15 En ambas formulaciones de vacuna, los conjugados PS 11-valentes estaban compuestos por los siguientes conjugados PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT y PS6B-DT. La vacuna usada era una dosis 1/5 de la dosis humana de la vacuna (5 µg de cada sacárido por dosis humana excepto para 6B [10 µg]) conjugado de acuerdo con las condiciones de la Tabla 6 (Ejemplo 4), excepto 19F que se preparó de acuerdo con las siguientes condiciones del procedimiento CDAP: sacárido ajustado en tamaño a 9 mg/ ml, PD a 5 mg/ ml, una proporción inicial PD/PS de 1,2/1, una concentración de CDAP de 0,75 mg/mg de PS, pHa=pHc=pHq 9,0/9,0/9,0 y un tiempo de acoplamiento de 60 min.

20 Los niveles de ELISA IgG anti-PS y los títulos de opsono-fagocitosis se dosificaron en sueros recogidos en el día 42. Las frecuencias de células B de memoria anti-PS3 se midieron por Elispot a partir de células sanguíneas periféricas recogidas en el día 42.

25 De acuerdo con los resultados mostrados a continuación en este documento, el adyuvante C mejoraba significativamente la inmunogenicidad de conjugados PS 11-valentes frente a conjugados con AlPO4 en monos viejos. El nuevo adyuvante potenciaba las respuestas IgG contra PS (Figura 1) y los títulos de anticuerpos de opsono-fagocitosis (Tabla 14). También hubo evidencias que apoyan que la frecuencia de células B de memoria específicas para PS3 se aumenta por el uso de adyuvante C (Figura 2).

**Tabla 14. Inmunogenicidad del conjugado en monos rhesus viejos (títulos de opsonofagocitosis post-II)**

|                  |                | PS1 | PS3  | PS4 | PS5 | PS6B | PS7F  | PS9V | PS14 | PS18C | PS19F | PS23F |
|------------------|----------------|-----|------|-----|-----|------|-------|------|------|-------|-------|-------|
| 11-valente AIPO4 | Pre-inmune     | <8  | 5    | <8  | 5   | <8   | 16    | <8   | <8   | <8    | <8    | <8    |
|                  | día 14 post II | 8   | 181  | 64  | 49  | 64   | 4096  | 42   | 37   | 169   | 64    | <64   |
| 11 valente Ady-C | Pre-inmune     | 5   | 9    | <8  | 5   | 8    | 37    | <8   | <8   | <8    | <8    | <8    |
|                  | día 14 post II | 776 | 1351 | 891 | 676 | 6208 | 16384 | 111  | 161  | 7132  | 2048  | <64   |

**Elispot de células B**

5 El principio del ensayo se basa en el hecho de que las células B de memoria maduran en células plasmáticas in vitro después del cultivo con CpG durante 5 días. Las células plasmáticas específicas de antígeno generadas in vitro pueden detectarse fácilmente y por lo tanto pueden enumerarse usando el ensayo elispot de células B. La cantidad de células plasmáticas específicas refleja la frecuencia de células B de memoria al inicio del cultivo.

En resumen, las células plasmáticas generadas in vitro se incuban en placas de cultivo recubiertas con antígeno. Las células plasmáticas específicas de antígeno forman manchas de anticuerpo/antígeno, que se detectan por un procedimiento inmunoenzimático convencional y se enumeran como células B de memoria.

10 En el presente estudio, se han usado polisacáridos para recubrir las placas de cultivo para enumerar las células B de memoria respectivas. Los resultados se expresan como una frecuencia de células B de memoria específicas de PS dentro de un millón de células B de memoria.

15 El estudio muestra que el adyuvante C puede ser capaz de aliviar el problema conocido de la capacidad de refuerzo de PS3 (véase el 5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, Abril 2-6 2006, Alice Springs, Central Australia. Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p 245, PO10.06).

**Ejemplo 6. Eficacia de neumolisina destoxificada (dPly) como un vehículo proteico para potenciar la inmunogenicidad de PS 19F en ratones Balb/c jóvenes**

Se inmunizaron grupos de 40 ratones Balb/c hembra (4 semanas de edad) IM en los días 0, 14 y 28 con 50 µl de PS sencillo 4-valente o PS conjugado con dPly 4-valente, ambos mezclados con adyuvante C.

20 Ambas formulaciones de vacuna estaban compuestas por 0,1 µg (cantidad de sacárido) de cada uno de los siguientes PS: PS8, PS12F, PS19F y PS22F.

Los niveles de ELISA IgG anti-PS se dosificaron en sueros recogidos en el día 42.

25 La respuesta anti-PS19F, mostrada como un ejemplo en la Figura 3, estuvo muy potenciada en ratones administrados con conjugados dPly 4-valentes en comparación con ratones inmunizados con el PS sencillo. La misma mejora se observó para las respuestas IgG anti-PS8, 12F y 22F (datos no mostrados).

**Ejemplo 7. Eficacia de proteína de la triada de histidina D de neumococos (PhtD) como vehículo proteico para potenciar la inmunogenicidad de PS 22F en ratones Balb/c jóvenes**

Se inmunizaron grupos de 40 ratones Balb/c hembra (4 semanas de edad) IM en los días 0, 14 y 28 con 50 µl de PS sencillo 4-valente o PS conjugado con PhtD 4-valente, ambos mezclados con adyuvante C.

30 Ambas formulaciones de vacuna estaban compuestas por 0,1 µg (cantidad de sacárido) de cada uno de los siguientes PS: PS8, PS12F, PS19F y PS22F.

Los niveles de ELISA IgG anti-PS se dosificaron en sueros recogidos en el día 42.

35 La respuesta anti-PS22F, mostrada como un ejemplo en la Figura 4, estuvo muy potenciada en ratones administrados con conjugados PhtD 4-valentes en comparación con ratones inmunizados con el PS sencillo. La misma mejora se observó para las respuestas IgG anti-PS8, 12F y 22F (datos no mostrados).

**Ejemplo 8. Inmunogenicidad en ratones C57Bl viejos de conjugados PS 13-valentes que contenían 19A-dPly y 22F-PhtD**

Se inmunizaron grupos de 30 ratones C57Bl viejos (>69 semanas de edad) IM en los días 0, 14 y 28 con 50 µl de conjugados PS 11-valentes o conjugados PS 13-valente, ambos mezclados con adyuvante C (véase a continuación).

40 La formulación de vacuna 11-valente estaba compuesta por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y los comentarios sobre la vacuna 11 valente analizada en la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y los comentarios sobre la vacuna 13 valente analizada en la Tabla 2 [usando 22F conjugado directamente]). En los grupos 2 y 4 el vehículo neumolisina se destoxificó con tratamiento por GMBS, en los grupos 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los grupos 4 y 5 se usó una fusión PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó 19A a toxoide diftérico y 22F a proteína D.

50 Los niveles de ELISA IgG anti-PS19A y 22F se dosificaron en sueros individuales recogidos en el día 42. La respuesta ELISA IgG generada contra los otros PS se midió en sueros combinados.

Los 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna conjugada 13-valente demostraron ser inmunogénicos en ratones C57Bl viejos (Tabla 15). La respuesta inmune inducida contra los otros PS no afectó negativamente en los ratones administrados con la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

5 **Tabla 15. Inmunogenicidad de PS en ratones C57Bl viejos (niveles de IgG post-III)**

| Ratones C57 Black viejos |                                   |  |   |  |   |  |
|--------------------------|-----------------------------------|--|---|--|---|--|
| ELISA                    | GRUPO 1                           | GRUPO 2  | GRUPO 3   | GRUPO 4  | GRUPO 5   | GRUPO 6  |
|                          | <b>11V</b><br>0,1 µg/ 50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly gmb</b> s 22F-PhtD<br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly formol</b> 22F-PhtD<br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly gmb</b> s 22F-PhtD-E<br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly formol</b> 22F-PhtD-E<br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-DT 22F-PD</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C |
| <b>1</b>                 | <b>promedio Combinación</b>       | <b>19,30</b>   | <b>20,20</b>  | <b>24,40</b>   | <b>12,80</b>  | <b>12,10</b>                                   |
| <b>3</b>                 | <b>promedio Combinación</b>       | <b>6,32</b>  | <b>4,84</b>   | <b>5,21</b>  | <b>6,74</b>   | <b>2,38</b>                                    |
| <b>4</b>                 | <b>promedio Combinación</b>       | <b>60,9</b>  | <b>67,1</b>   | <b>51,4</b>  | <b>47,4</b>   | <b>41,1</b>                                    |
| <b>5</b>                 | <b>promedio Combinación</b>       | <b>1,34</b>  | <b>3,81</b>   | <b>3,06</b>  | <b>2,75</b>   | <b>1,23</b>                                    |
| <b>6B</b>                | <b>promedio Combinación</b>       | <b>4,41</b>  | <b>4,12</b>   | <b>5,88</b>  | <b>1,58</b>   | <b>2,31</b>                                    |
| <b>7F</b>                | <b>promedio Combinación</b>       | <b>0,83</b>  | <b>0,81</b>   | <b>1,65</b>  | <b>1,98</b>   | <b>0,89</b>                                    |
| <b>9V</b>                | <b>promedio Combinación</b>       | <b>13,8</b>  | <b>23,7</b>   | <b>20,0</b>  | <b>13,1</b>   | <b>15,5</b>                                    |
| <b>14</b>                | <b>promedio Combinación</b>       | <b>25,73</b>   | <b>42,96</b>  | <b>34,12</b>   | <b>32,53</b>  | <b>23,97</b>                                   |
| <b>18C</b>               | <b>promedio Combinación</b>       | <b>13,4</b>  | <b>20,1</b>   | <b>11,9</b>  | <b>9,1</b>  | <b>8,3</b>                                     |
| <b>19F</b>               | <b>promedio Combinación</b>       | <b>57,5</b>  | <b>90,0</b>   | <b>63,8</b>  | <b>36,5</b>   | <b>47,0</b>                                    |
| <b>23F</b>               | <b>promedio Combinación</b>       | <b>NR</b>  | <b>NR</b>   | <b>NR</b>  | <b>NR</b>   | <b>NR</b>                                      |
| <b>19A</b>               | <b>GMC</b>                        | <b>0,06</b>  | <b>0,09</b>   | <b>0,25</b>  | <b>0,08</b>   | <b>0,23</b>                                    |
|                          | <b>IC</b>                         | 0,04-0,1   | 0,05-0,14   | 0,15-0,41  | 0,06-0,12   | 0,14-0,38                                      |
|                          | <b>%sero</b>                      | 33%  | 47%   | 83%  | 53%   | 80%  |
|                          | <b>GMC</b>                        | <b>NR</b>  | <b>5,81</b>   | <b>3,76</b>  | <b>0,54</b>   | <b>0,85</b>                                    |
|                          | <b>IC</b>                         |  | 3,2-10,6  | 1,8-7,9  | 0,3-1,1   | 0,4-1,7  |
|                          | <b>%sero</b>                      | 0%   | 97%   | 90%  | 77%   | 97%  |



**Ejemplo 9. Inmunogenicidad en ratones Balb/c jóvenes de conjugados PS 13-valentes que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD**

Se inmunizaron grupos de 30 ratones Balb/c jóvenes (4 semanas de edad) IM en los días 0, 14 y 28 con 50 µl de conjugados PS 11-valentes o conjugados PS 13-valentes, ambos mezclados con adyuvante C (véase a continuación).

5

La formulación de vacuna 11-valente estaba compuesta por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y los comentarios sobre la vacuna 11 valente analizada en la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y los comentarios sobre la vacuna 13 valente analizada en la Tabla 2 [usando 22F conjugado directamente]). En los grupos 2 y 4 el vehículo neumolisina se detoxificó con tratamiento por GMBS, en los grupos 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los grupos 4 y 5 se usó una fusión PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó 19A a toxoide diftérico y 22F a proteína D.

10

15

Los niveles de ELISA IgG anti-PS19A y 22F se dosificaron en sueros individuales recogidos en el día 42. La respuesta ELISA IgG generada contra los otros PS se midió en sueros combinados.

20

Los 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna conjugada 13-valente demostraron ser inmunogénicos en ratones C57Bl viejos (Tabla 16). La respuesta inmune inducida contra los otros PS no afectó negativamente en los ratones administrados con la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

**Tabla 16. Inmunogenicidad de PS en ratones Balb/c jóvenes (niveles de IgG post-III)**

| Ratones BalbC |                            |  |  |  |  |   |       |
|---------------|----------------------------|--|--|--|--|---|-------|
| ELISA         | GRUPO 1                    | GRUPO 2  | GRUPO 3  | GRUPO 4  | GRUPO 5  | GRUPO 6                                 |       |
|               | 11V<br>0,1 µg/ 50 µl Ady C | 11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD<br>0,1 µg/50 µl Ady C | 11V 19A-dPly formol 22F-PhtD<br>0,1 µg/50 µl Ady C | 11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD-E<br>0,1 µg/50 µl Ady C | 11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E<br>0,1 µg/50 µl Ady C | 11V 19A-DT 22F-PD<br>0,1 µg/50 µl Ady C |       |
| 1             | promedio Combinación       | 131,70   | 101,20   | 83,00  | 82,40  | 67,90                                   | 85,50 |
| 3             | promedio Combinación       | 21,85  | 10,38  | 12,53  | 8,83   | 8,73                                    | 14,98 |
| 4             | promedio Combinación       | 147,4  | 127,0  | 104,4  | 95,0   | 113,6                                   | 114,2 |
| 5             | promedio Combinación       | 21,38  | 20,29  | 18,26  | 18,95  | 18,02                                   | 23,04 |
| 6B            | promedio Combinación       | 1,97   | 4,76   | 3,72   | 2,35   | 1,43                                    | 1,05  |
| 7F            | promedio Combinación       | 7,69   | 4,58   | 4,77   | 4,24   | 3,92                                    | 3,94  |
| 9V            | promedio Combinación       | 30,1   | 30,7   | 26,5   | 21,4   | 23,4                                    | 28,3  |
| 14            | promedio Combinación       | 28,78  | 27,67  | 26,23  | 21,54  | 24,34                                   | 13,73 |
| 18C           | promedio Combinación       | 53,4   | 52,37  | 46,5   | 57,8   | 47,8                                    | 75,8  |
| 19F           | promedio Combinación       | 186,6  | 157,7  | 169,3  | 178,9  | 181,9                                   | 223,2 |

(continuación)

| Ratones BalbC                   |                                   |  |   |  |   |  |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|---|--|---|--|
| ELISA                           | GRUPO 1                           | GRUPO 2  | GRUPO 3   | GRUPO 4  | GRUPO 5   | GRUPO 6  |
|                                 | <b>11V</b><br>0,1 µg/ 50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly gmbms 22F-PhtD</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly formol 22F-PhtD</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly gmbms 22F-PhtD-E</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-DT 22F-PD</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C |
| <b>23F promedio Combinación</b> | <b>4,98</b>                       | <b>3,9</b>   | <b>5,11</b>   | <b>0,57</b>  | <b>3,13</b>   | <b>4,57</b>                                    |
| <b>19A GMC</b>                  | <b>0,4</b>                        | <b>32,8</b>  | <b>25,1</b>   | <b>21,6</b>  | <b>18,9</b>   | <b>23,5</b>                                    |
| <b>IC</b>                       | 0,2-0,6                           | 26,4-40,7  | 20,6-30,6   | 17,5-26,7  | 15,1-23,5   | 19,5-28,5                                      |
| <b>%sero</b>                    | 93%                               | 100%   | 100%  | 100%   | 100%  | 100%   |
| <b>22F GMC</b>                  | <b>NR</b>                         | <b>3,99</b>  | <b>3,76</b>   | <b>6,27</b>  | <b>8,70</b>   | <b>18,76</b>                                   |
| <b>IC</b>                       |                                   | 1,9-8,42   | 1,8-8   | 3,8-10,4   | 5,4-13,9  | 15,2-23,1                                      |
| <b>%sero</b>                    | 0%                                | 93%  | 100%  | 100%   | 100%  | 100%   |

**Ejemplo 10. Inmunogenicidad en cobayas de conjugados PS 13-valentes que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD**

- 5 Se inmunizaron grupos de 20 cobayas jóvenes (cepa Hartley; 5 semanas de edad) IM en los días 0, 14 y 28 con 125 µl de conjugados PS 11-valentes o conjugados PS 13-valentes, ambos mezclados con adyuvante C (véase a continuación). La formulación de vacuna 11-valente estaba compuesta por 0,25 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y los comentarios sobre la vacuna 11 valente analizada en la Tabla 2). La
- 10 formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y los comentarios sobre la vacuna 13 valente analizada en la Tabla 2 [usando 22F conjugado directamente]). En los grupos 2 y 4 el vehículo neumolisina se destoxificó con tratamiento por GMBS, en los grupos 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los grupos 4 y 5 se usó una fusión PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó 19A a toxoide diftérico y 22F a proteína D.
- 15 Los niveles de ELISA IgG anti-PS19A y 22F se dosificaron en sueros individuales recogidos en el día 42. La respuesta ELISA IgG generada contra los otros PS se midió en sueros combinados.

**Tabla 17. Inmunogenicidad de PS en ratones Balb/c jóvenes (niveles de IgG post-III)**

| Cobayas                       |                                   |  |   |  |   |  |
|-------------------------------|-----------------------------------|--|---|--|---|--|
| ELISA                         | GRUPO 1                           | GRUPO 2  | GRUPO 3   | GRUPO 4  | GRUPO 5   | GRUPO 6  |
|                               | <b>11V</b><br>0,1 µg/ 50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly gmbms 22F-PhtD</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly formol 22F-PhtD</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly gmbms 22F-PhtD-E</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C | <b>11V 19A-DT 22F-PD</b><br>0,1 µg/50 µl Ady C |
| <b>1 promedio Combinación</b> | <b>78,00</b>                      | <b>77,21</b>   | <b>76,15</b>  | <b>68,77</b>   | <b>68,59</b>  | <b>81,04</b>                                   |
| <b>3 promedio Combinación</b> | <b>7,75</b>                       | <b>9,31</b>  | <b>12,73</b>  | <b>7,94</b>  | <b>4,75</b>   | <b>9,59</b>                                    |
| <b>4 promedio Combinación</b> | <b>130,7</b>                      | <b>94,4</b>  | <b>132,6</b>  | <b>166,8</b>   | <b>85,0</b>   | <b>101,3</b>                                   |

ES 2 369 604 T3

(continuación)

| Cobayas |                               |   |  |   |  |  |            |
|---------|-------------------------------|---|--|---|--|--|------------|
| ELISA   | GRUPO 1                       | GRUPO 2   | GRUPO 3  | GRUPO 4   | GRUPO 5  | GRUPO 6  |            |
|         | 11V<br>0,1 µg/ 50 µl Ady<br>C | 11V 19A-dPly<br>gmbbs 22F-<br>PhtD<br>0,1 µg/50 µl<br>Ady C | 11V 19A-dPly<br>formol 22F-<br>PhtD<br>0,1 µg/50 µl<br>Ady C | 11V 19A-dPly<br>gmbbs 22F-<br>PhtD-E<br>0,1 µg/50 µl<br>Ady C | 11V 19A-<br>dPly formol<br>22F-PhtD-E<br>0,1 µg/50 µl<br>Ady C | 11V 19A-<br>DT 22F-PD<br>0,1 µg/50 µl<br>Ady C |            |
| 5       | promedio<br>Combinación       | 109,10  | 117,10   | 110,70  | 158,40   | 74,10  | 100,40     |
| 6B      | promedio<br>Combinación       | 3,14  | 4,26   | 14,4  | 7,63   | 6,3  | 7,52       |
| 7F      | promedio<br>Combinación       | 154,2   | 216,0  | 240,0   | 181,0  | 142,0  | 179,1      |
| 9V      | promedio<br>Combinación       | 90,69   | 105,45   | 98,20   | 93,45  | 54,12  | 73,05      |
| 14      | promedio<br>Combinación       | 71,19   | 77,18  | 46,53   | 59,67  | 38,47  | 53,69      |
| 18C     | promedio<br>Combinación       | 109,4   | 122,3  | 137,1   | 79,9   | 73,7   | 83,1       |
| 19F     | promedio<br>Combinación       | 73,9  | 102,5  | 112,2   | 75,5   | 62,3   | 72,1       |
| 23F     | promedio<br>Combinación       | 19,19   | 30,74  | 29,44   | 31,52  | 19,13  | 24,94      |
| 19A     | GMC                           | 0,4   | 25,58  | 41,49   | 14,25  | 27,49  | 6,74       |
|         | IC                            | 0,24-0,68   | 12-54,5  | 24,4-70,5   | 5,9-34,6   | 16,6-45,4                                      | 4-11,3     |
|         | %sero                         | 75%   | 100%   | 100%  | 100%   | 100%   | 100%       |
| 22F     | GMC                           | 0,12  | 2,51   | 3,67  | 45,74  | 30,68  | 96,38      |
|         | IC                            | 0,09-0,16   | 0,94-6,73  | 1,59-8,42   | 29,3-71,4  | 17-53,3  | 73,5-126,4 |
|         | %sero                         | 10%   | 95%  | 95%   | 100%   | 100%   | 100%       |

**Ejemplo 11: Formulaciones que se están preparando y ensayando**

- 5 a) Se preparan las siguientes formulaciones (usando la vacuna 13 valente de la tabla 1 y el serotipo 3 de la tabla 5 - véanse los comentarios sobre la vacuna 14 valente analizada en la Tabla 2 [usando 22F conjugado directamente o a través de un enlazador ADH]). Los sacáridos se formulan con fosfato de aluminio y 3D-MPL como se muestra a continuación.

ES 2 369 604 T3

| <b>14V 25 µg MPL</b>                               |                  |       |        |                    |       | <b>14V 10µg MPL</b>                                |                  |       |        |                    |       |
|--|------------------|-------|--------|--------------------|-------|--|------------------|-------|--------|--------------------|-------|
| <b>Suma del contenido de aluminio BAC -&gt; FF</b> |                  |       |        |                    |       | <b>Suma del contenido de aluminio BAC -&gt; FF</b> |                  |       |        |                    |       |
| <b>Por Dosis:</b>                                  |                  |       |        |                    |       | <b>Por Dosis:</b>                                  |                  |       |        |                    |       |
| PS   | vehículo         | µg PS | µg MPL | prop. PS/Ai<br>1/x | µg Al | PS   | vehículo         | µg PS | µg MPL | prop. PS/Ai<br>1/x | µg Al |
| 1  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 1  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 3  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 3  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 4  | PD               | 3     |        | 10                 | 30    | 4  | PD               | 3     |        | 10                 | 30    |
| 5  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 5  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 6A   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 6A   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 6B   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 6B   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 7F   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 7F   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 9V   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 9V   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 14   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 14   | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| 18C  | TT <sub>AH</sub> | 3     |        | 10                 | 45    | 18C  | TT <sub>AH</sub> | 3     |        | 10                 | 45    |
| 19A  | dPly             | 3     |        | 10                 | 30    | 19A  | dPly             | 3     |        | 10                 | 30    |
| 19F  | DT               | 3     |        | 10                 | 30    | 19F  | DT               | 3     |        | 10                 | 30    |
| 22F  | PhtD             | 3     |        | 10                 | 30    | 22F  | PhtD             | 3     |        | 10                 | 30    |
| 23F  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    | 23F  | PD               | 1     |        | 10                 | 10    |
| BAC MPL 50/200                                     |                  |       | 25     | 4                  | 100   | BAC MPL 50/200                                     |                  |       | 10     | 4                  | 100   |
| Contenido de aluminio FF                           |                  |       |        | Suma=              | 355   | Contenido de aluminio FF                           |                  |       |        | Suma=              | 355   |

b) La misma formulación de sacárido se adyuvanta con cada uno de los siguientes adyuvantes:

- En la siguiente tabla se muestra la concentración de los componentes de emulsión por 500 µl de dosis.

|    |              |                     |                     |                     |
|----|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 5  |              | Adyuvante A1        | Adyuvante A2        | Adyuvante A3        |
|    | Ingredientes | 250 µl emulsión o/w | 125 µl emulsión o/w | 50 µl emulsión o/w  |
|    | alfa         | 11,88 mg            | 5,94 mg             | 2,38 mg             |
|    | Tocoferol    |                     |                     |                     |
|    | Escualeno    | 10,7 mg             | 5,35 mg             | 2,14 mg             |
| 10 | Tween 80     | 4,85 mg             | 2,43 mg             | 0,97 mg             |
|    |              | Adyuvante A4        | Adyuvante A5        | Adyuvante A6        |
|    | Ingredientes | 250µl emulsión o/w  | 250 µl emulsión o/w | 125 µl emulsión o/w |
|    | alfa         | 11,88 mg            | 11,88 mg            | 5,94 mg             |
|    | Tocoferol    |                     |                     |                     |
|    | Escualeno    | 10,7 mg             | 10,7 mg             | 5,35 mg             |
|    | Tween 80     | 4,85 mg             | 4,85 mg             | 2,43 mg             |
| 15 | 3D-MPL       | 50 µg               | 25 µg               | 11 µg               |

c) Los sacáridos también se formulan con dos adyuvantes basados en liposomas:

**Composición del adyuvante B1**

**Cualitativo Cuantitativo (por 0,5 ml de dosis)**

Liposomas:

- 5 - DOPC 1 mg
- colesterol 0,25 mg
- 3DMPL 50 µg
- QS21 50 µg
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,124 mg tampón
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,290 mg tampón
- 10 NaCl 2,922 mg
- (100 mM)
- WFI añadir c.s. 0,5 ml disolvente
- pH 6,1
- 1. Concentración total de PO<sub>4</sub> = 50 mM

15 **Composición del adyuvante B2**

**Cualitativo Cuantitativo (por 0,5 ml de dosis)**

Liposomas:

- DOPC 0,5 mg
- colesterol 0,125 mg
- 20 3DMPL 25 µg
- QS21 25 µg
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,124 mg tampón
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,290 mg tampón
- NaCl 2,922 mg
- 25 (100 mM)
- WFI añadir c.s. 0,5 ml disolvente
- pH 6,1

d) Los sacáridos también se formulan con adyuvante C (véase anteriormente para otras composiciones donde se ha usado este adyuvante):

30 **Cualitativo Cuantitativo (por 0,5 ml de dosis)**

Emulsión de aceite en agua: 50 µl

- escualeno 2,136 mg
- α-tocoferol 2,372 mg
- Tween 80 0,97 mg
- 35 - colesterol 0,1 mg
- 3DMPL 50 µg
- QS21 50 µg
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,470 mg tampón
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,219 mg tampón
- 40 NaCl 4,003 mg
- (137 mM)
- KCl 0,101 mg
- (2,7 mM)
- WFI añadir c.s. 0,5 ml disolvente
- 45 pH 6,8

**Ejemplo 12. Impacto de la química de conjugación sobre la inmunogenicidad del conjugado 22F-PhtD en ratones Balb/c**

Se inmunizaron grupos de 30 ratones Balb/c hembra por vía intramuscular (IM) en los días 0, 14 y 28 con formulaciones PS 13-valentes que contenían PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F (dosis: 0,3 µg de sacárido / PS para PS 4, 18C, 19A, 19F y 22F y 0,1 µg de sacárido / PS para los otros PS).

PS 18C se conjugó a toxoide tetánico, 19F a toxoide diftérico, 19A a Ply destoxificado con formol, 22F a PhtD y los otros PS a PD.

Se compararon dos formulaciones, constituidas por 22F-PhtD preparado por química de CDAP directa o 22F-AH-PhtD (PS derivatizado con ADH). Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y los comentarios en la Tabla 2 para las

características de la vacuna 13 valente preparada con 22F conjugado directamente o mediante un espaciador ADH. Las formulaciones de vacuna se suplementaron con adyuvante C.

Los niveles de ELISA IgG anti-PS22F y los títulos de opsono-fagocitosis se midieron en sueros recogidos en el día 42.

- 5 Se demostró que 22F-AH-PhtD era mucho más inmunogénico que 22F-PhtD en términos tanto de niveles de IgG (figura 5) como de títulos opsono-fagocítica (figura 6).

**Ejemplo 13. Impacto de nuevos adyuvantes sobre la inmunogenicidad de conjugados de PS capsular de *Streptococcus pneumoniae***

- 10 Se inmunizaron grupos de 40 ratones Balb/c hembra por vía IM en los días 0, 14 y 28 con formulaciones de PS 13-valentes que contenían PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F (dosis: 0,3 µg / PS para PS 4, 18C, 19A, 19F y 22F y 0,1 µg / PS para los otros PS).

PS 18C se conjugó a toxoide tetánico, 19F a toxoide diftérico, 19A a Ply destoxificado con formol, 22F a PhtD y los otros PS a PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y los comentarios en la Tabla 2 para las características de la vacuna 13 valente preparada con 22F conjugado directamente.

- 15 Se compararon cuatro formulaciones, suplementadas con AlPO<sub>4</sub>, adyuvante A1, adyuvante A4 o adyuvante A5.

Los niveles ELISA IgG anti-PS, Ply, PhtD y PD se midieron en sueros recogidos en el día 42 y se combinaron por grupo.

La siguiente proporción se calculó para cada antígeno: nivel de IgG inducido con el nuevo adyuvante ensayado / nivel de IgG inducido con AlPO<sub>4</sub>.

- 20 Todos los nuevos adyuvantes ensayados mejoraron en al menos 2 veces las respuestas inmunes contra conjugados 13-valentes en comparación con la formulación AlPO<sub>4</sub> clásica (figura 7).

**Ejemplo 14. Eficacia protectora de un combo PhtD/Ply destoxificado en un modelo de mono de neumonía por neumococos**

- 25 Se inmunizaron grupos de 6 monos rhesus (de 3 a 8 años de edad), seleccionados porque tenían los niveles más bajos pre-existentes de anticuerpos anti-19F, por vía intramuscular en los días 0 y 28 con conjugados PS 11-valentes (es decir 1 µg de PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F, y 3 µg de PS 4, 18C y 19F) o PhtD (10 µg) + Ply destoxificado con formol (10 µg) o el adyuvante solo.

- 30 PS 18C se conjugó a toxoide tetánico, 19F a toxoide diftérico y los otros PS a PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y los comentarios en la Tabla 2 para las características de la vacuna 11 valente. Todas las formulaciones se suplementaron con adyuvante C.

Se inocularon neumococos tipo 19F (5.10<sup>8</sup> cfu) en el pulmón derecho en el día 42. Las colonias se contaron en lavados bronco-alveolares recogidos en los días 1, 3 y 7 después de la estimulación. Los resultados se expresaron como la cantidad de animales por grupo muertos, con el pulmón colonizado o despejado en el día 7 después de la estimulación.

- 35 Como se muestra en la figura 8, se obtuvo una buena protección cercana a la significancia estadística (a pesar de la baja cantidad de animales usados) con conjugados 11-valentes y el combo PhtD+dPly (p < 0,12, ensayo exacto de Fisher) en comparación con el grupo de adyuvante solo.

**Ejemplo 15. Impacto de la química de conjugación sobre la respuesta de anticuerpos anti-PhtD y la eficacia protectora contra una estimulación tipo 4 inducida por conjugados 22F-PhtD**

- 40 Se inmunizaron grupos de 20 ratones OF1 hembra por vía intramuscular en los días 0 y 14 con 3 µg de 22F-PhtD (preparado por química de CDAP directa) o 22F-AH-PhtD (PS derivatizado con ADH), o el adyuvante solo. Ambos conjugados 22F monovalentes se prepararon por los procedimientos del Ejemplo 2 (véanse también la Tabla 1 y la Tabla 2). Cada formulación se suplementó con adyuvante C.

Los niveles ELISA IgG anti-PhtD se midieron en sueros recogidos en el día 27.

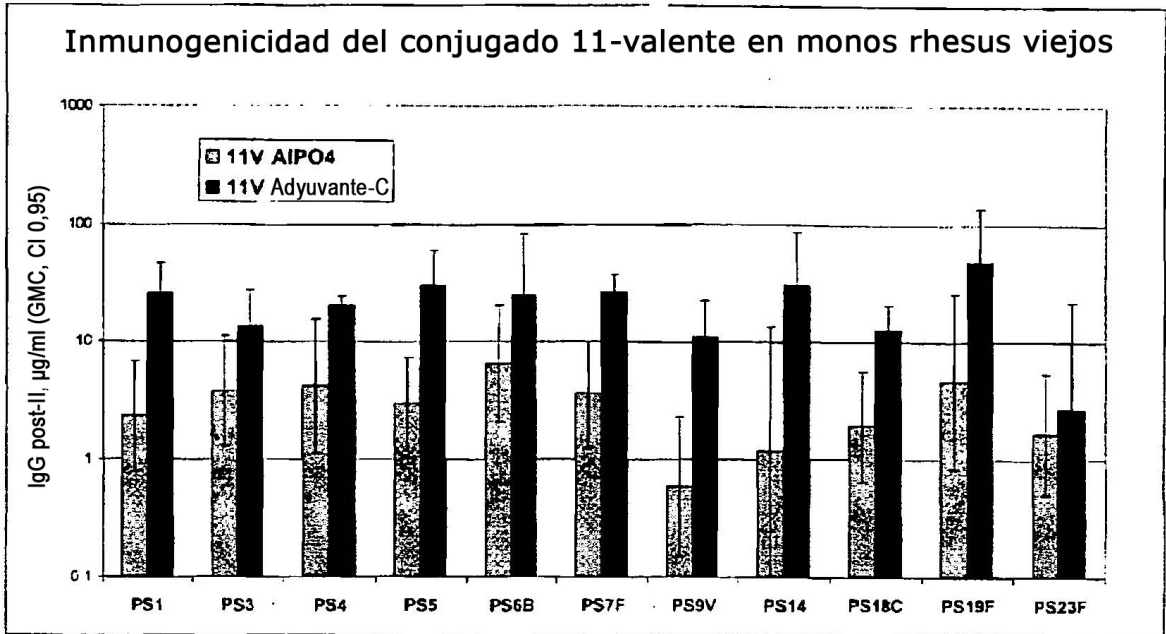
- 45 Los ratones se estimularon de forma intranasal con 5.10<sup>6</sup> cfu de neumococos tipo 4 en el día 28 (es decir un serotipo de neumococos potencialmente no cubierto por el PS presente en la formulación de vacuna ensayada). La mortalidad inducida se controló hasta el día 10 después de la estimulación.

22F-AH-PhtD inducía una respuesta IgG anti-PhtD significativamente mayor y una mejor protección contra la estimulación tipo 4 que 22F-PhtD.

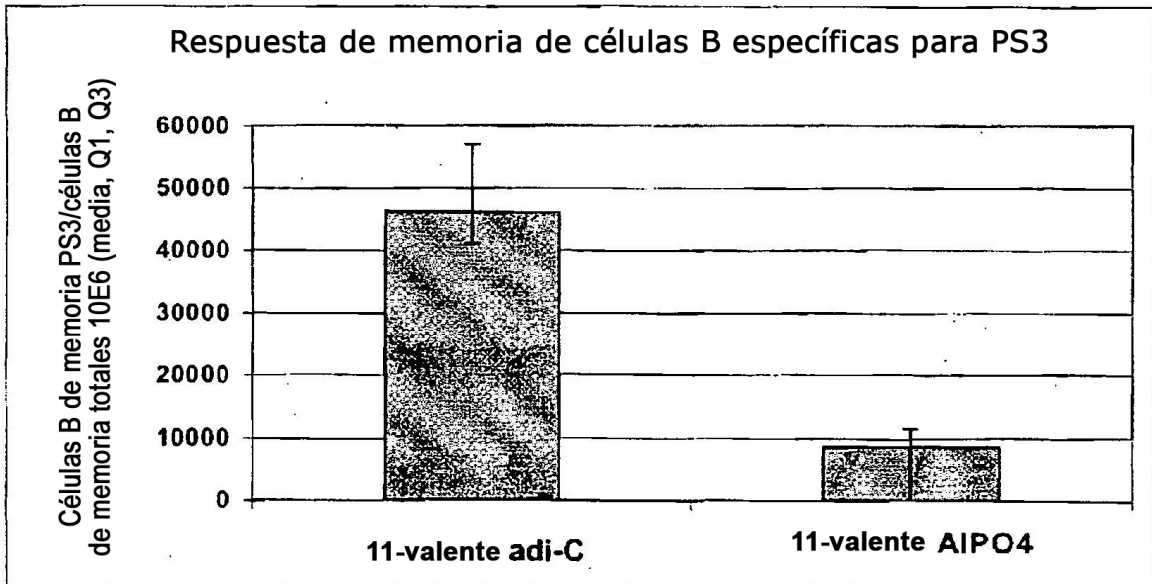
50

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición inmunogénica de *Streptococcus pneumoniae* que comprende 9 o más, 10 o más, 11 o más, 13 o más, o 14 o más sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados a 2 o más proteínas vehículo diferentes, en la que la composición comprende el sacárido capsular de serotipo 19F conjugado a toxoide diftérico (DT), pero no comprende sacárido capsular del serotipo 19A, para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 2.- La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el sacárido capsular de serotipo 19F es el único sacárido en la composición conjugado a toxoide diftérico (DT) para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 10 3.- Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que el sacárido capsular 19F se conjuga directamente a la proteína vehículo para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 15 4.- Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en la que el sacárido capsular 19F se conjuga a la proteína vehículo mediante un enlazador para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 5.- La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que el sacárido 19F se conjuga a la proteína vehículo o al enlazador usando química de CDAP para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 20 6.- La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que la proporción de proteína vehículo a sacárido 19F está entre 5:1 y 1:5, 4:1 y 1:1 ó 2:1 y 1:1, o 1,5:1 y 1,4:1 (p/p) para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 7.- La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que el tamaño promedio (por ejemplo,  $M_w$ ) del sacárido 19F está por encima de 100 kDa para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 25 8.- La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que la dosis del conjugado de sacárido 19F está entre 1 y 10  $\mu\text{g}$ , 1 y 5  $\mu\text{g}$ , o 1 y 3  $\mu\text{g}$  de sacárido para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 30 9.- Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 proteínas vehículo diferentes para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 10.- Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que una o más o todas las proteínas vehículo se seleccionan entre el grupo que consiste en DT, CRM197, TT, fragmento C, dPly, PhtA, PhyB, PhtD, PhtE, PhtDE, OmpC, PorS y proteína D de *Haemophilus influenzae* para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 35 11.- Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que la composición comprende el sacárido capsular 18C conjugado a TT para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 40 12.- La composición inmunogénica de la reivindicación 11, en la que 18C es el único sacárido en la composición conjugado a toxoide tetánico (TT) para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.
- 45 13.- Un uso de una composición inmunogénica que comprende 9 o más, 10 o más, 11 o más, 13 o más, o 14 o más sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados a 2 o más proteínas vehículo diferentes, en el que la composición comprende el sacárido capsular de serotipo 19F conjugado a toxoide diftérico (DT), pero no comprende sacárido capsular del serotipo 19A en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección con *Streptococcus pneumoniae* por cepas del serotipo 19A.

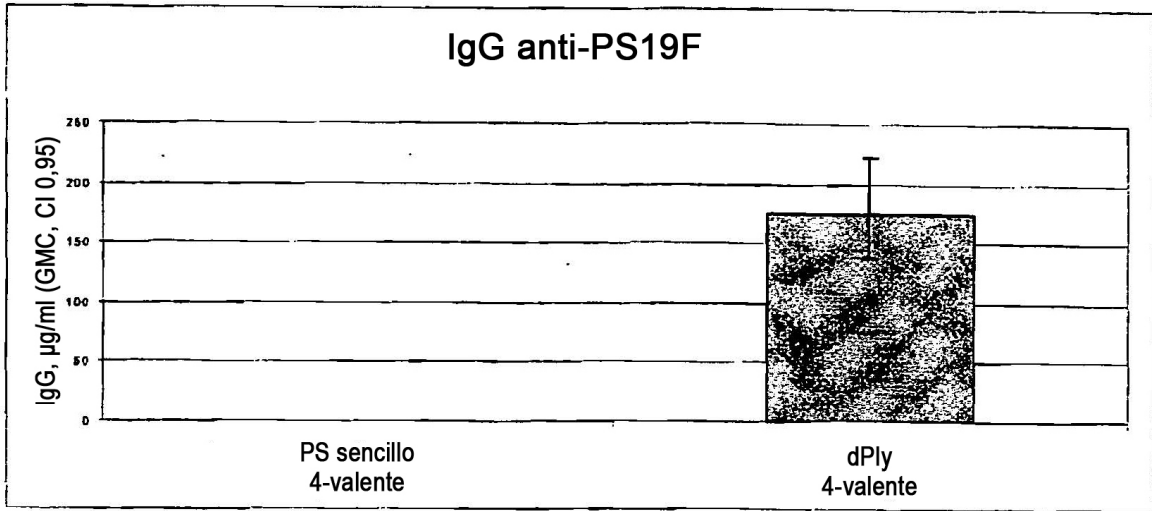


**Figura 1, inmunogenicidad del conjugado en monos rhesus viejos (niveles de IgG anti-PS post-II)**

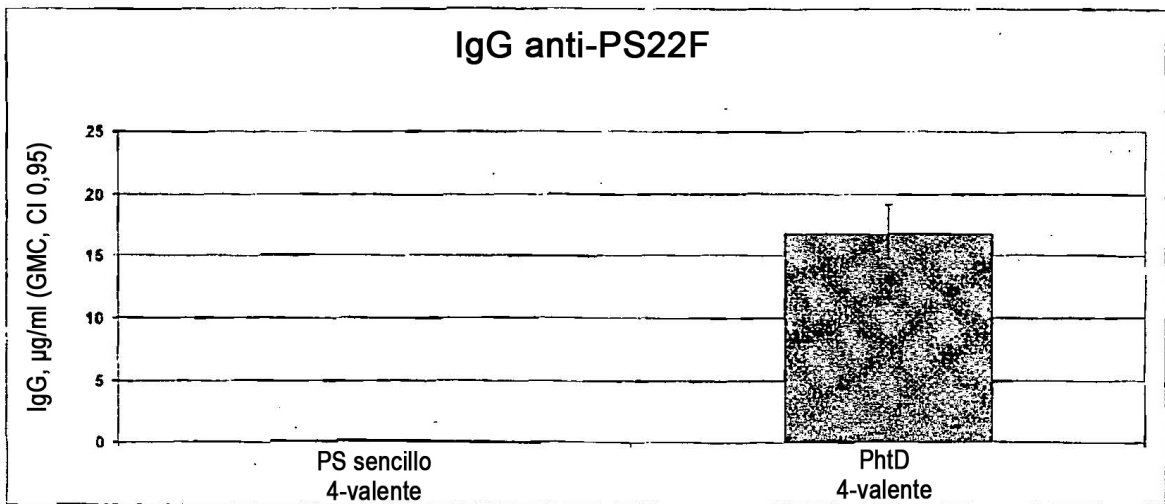


**Figura 2, inmunogenicidad del conjugado en monos rhesus viejos (frecuencias de células B de memoria anti-PS3 post-II)**





**Figura 3, inmunogenicidad PS19F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III)**



**Figura 4, inmunogenicidad PS22F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III)**

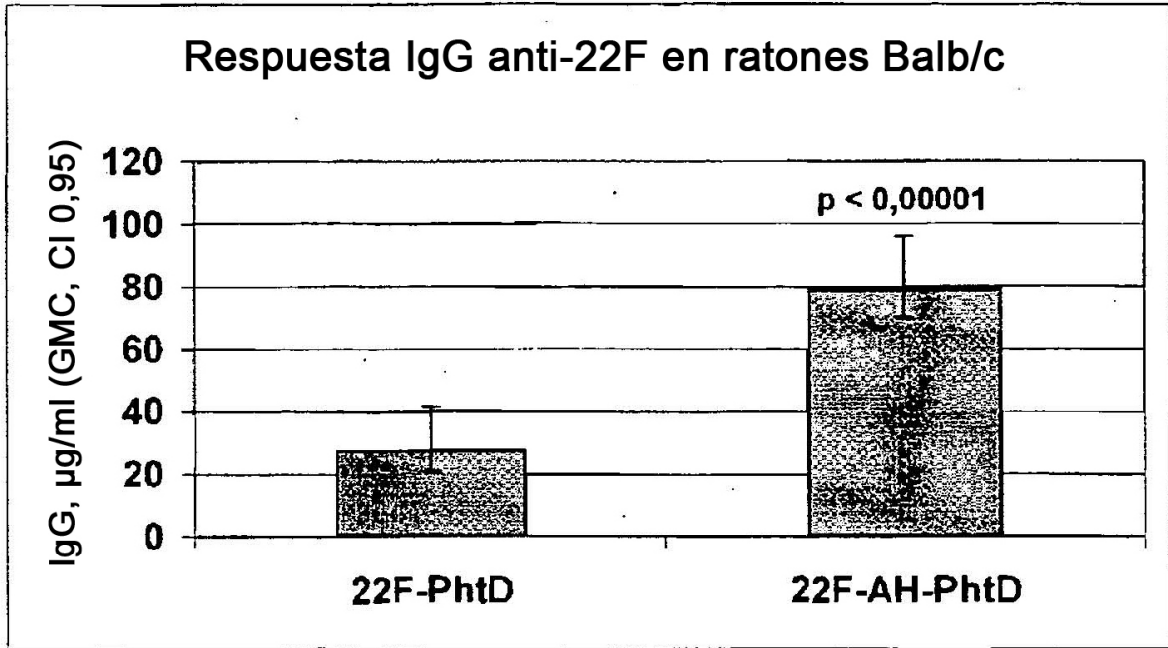


Figura 5, niveles séricos de anticuerpo IgG anti-PS

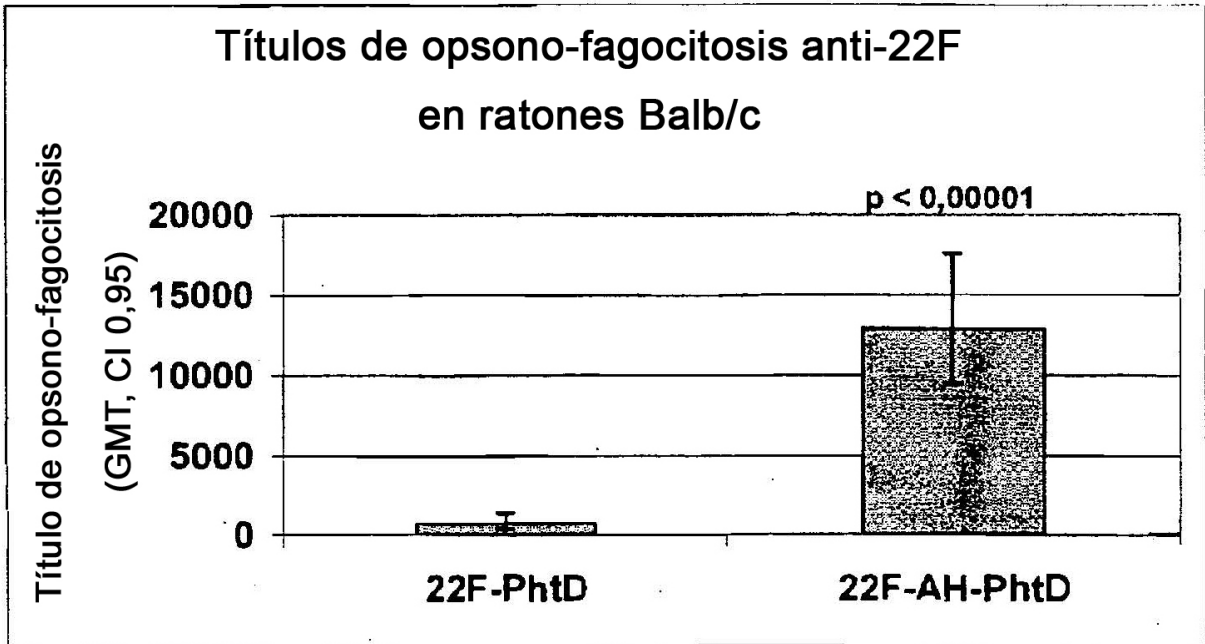
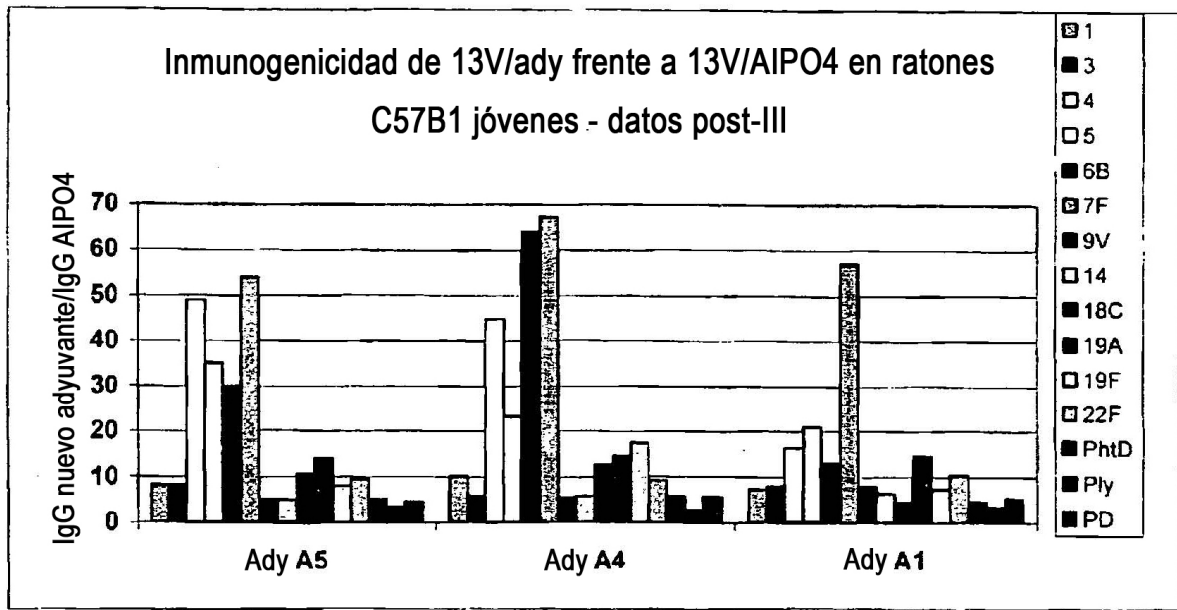
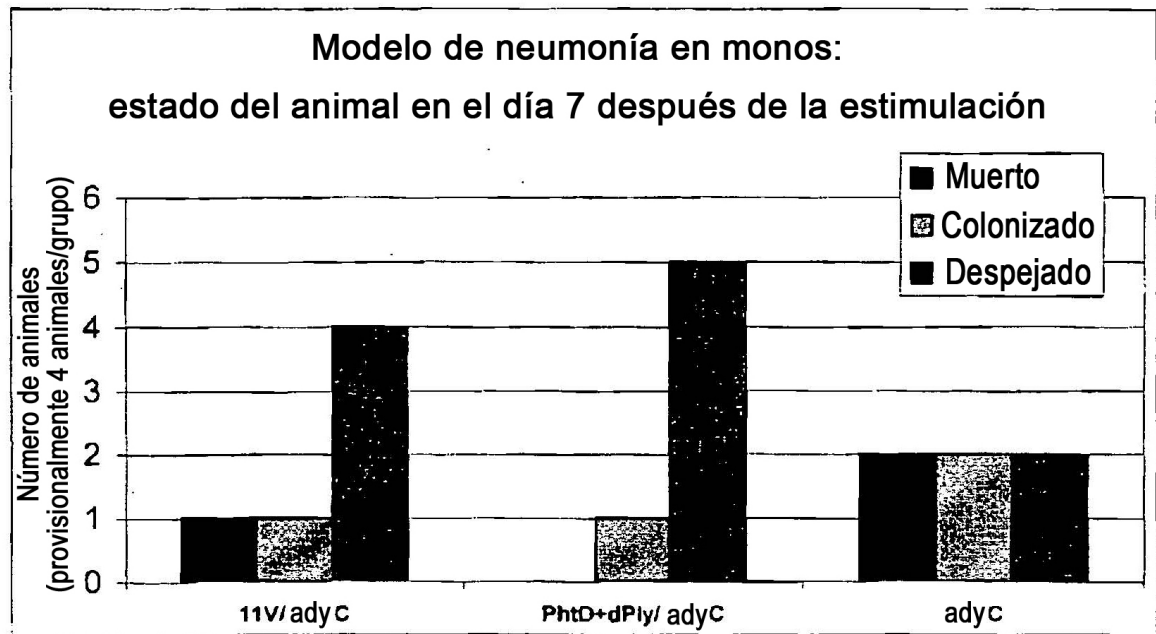


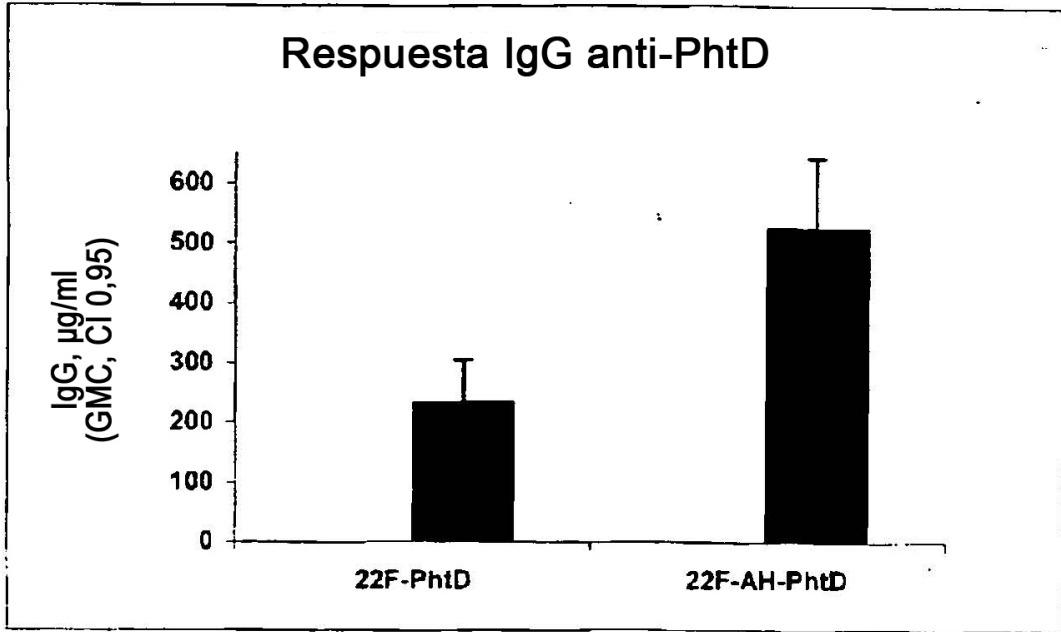
Figura 6, títulos de opsono-fagocitosis



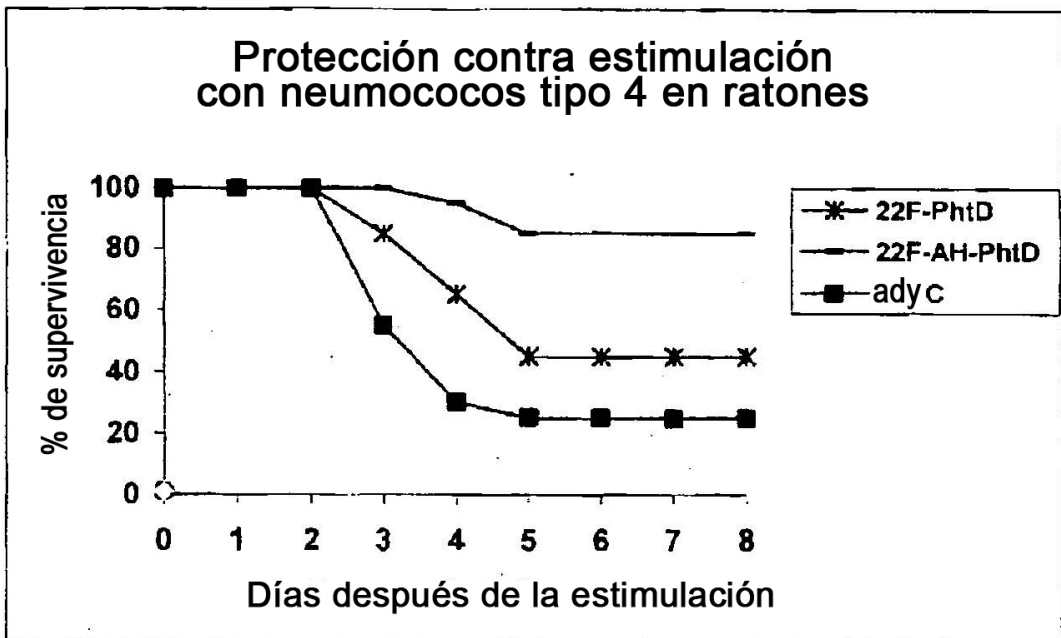
**Figura 7, comparación de las respuestas IgG inducidas con nuevos adyuvantes con la respuesta provocada con AIPO4**



**Figura 8, eficacia protectora de la combinación de proteínas PhtD + dPly contra la colonización pulmonar de 19F en monos rhesus**



**Figura 9 respuesta IgG sérica anti-PhtD**



**Figura 10 Protección contra estimulación con neumococos tipo 4 en ratones**