

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 704**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01960390 .1**

96 Fecha de presentación: **27.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1296715**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **COMPOSICIÓN DE VACUNA MULTIVALENTE.**

30 Prioridad:
29.06.2000 GB 0015999
03.04.2001 GB 0108363
03.04.2001 GB 0108364

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, DE

72 Inventor/es:
BOUTRIAU, Dominique;
CAPIAU, Carine;
DESMONS, Pierre, Michel;
LEMOINE, Dominique y
POOLMAN, Jan

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 704 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

Composición de vacuna multivalente

Composición de vacuna

5 La presente invención se refiere a formulaciones de vacuna de combinación nuevas. Las vacunas de combinación (que proporcionan protección frente a patógenos múltiples) son muy deseables con el fin de minimizar el número de inmunizaciones necesarias para conferir protección frente a patógenos múltiples, para reducir los costes de administración y para aumentar la aceptación y los índices de cobertura. El fenómeno bien documentado de competición antigénica (o interferencia) complica el desarrollo de vacunas multicomponente. La interferencia antigénica se refiere a la observación de que la administración de antígenos múltiples con frecuencia da como resultado una respuesta disminuida a determinados antígenos con relación a la respuesta inmune observada cuando tales antígenos se administran individualmente.

Se conocen vacunas de combinación que pueden prevenir *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y opcionalmente virus de la Hepatitis B y/o *Haemophilus influenzae* de tipo b (véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/24148 y WO 97/00697).

15 Paradiso y Lindberg, Dev Biol. Stand. (1996) vol. 87, páginas 269-275 divulgan combinaciones futuras que incluyen vacunas de glicoconjugado. Granhoff y col., Infection & Immunity (1997), vol. 65(5), páginas 1710-1715 divulgan inmunización frente a *Haemophilus influenzae* de tipo b y *Nesseiria meningitidis* de tipo C mediante inmunización primaria con una dosis convencional de 10 µg de cada oligosacárido conjugado a CRM₁₉₇ seguido por una inmunización de refuerzo con dosis bajas de 5 µg de oligosacáridos no conjugados.

20 Por consiguiente, la presente invención proporciona la reivindicación 1.

Los procedimientos para preparar toxoide tetánico (TT) se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, TT se produce preferentemente mediante purificación de la toxina a partir de un cultivo de *Clostridium tetani* seguido por destoxificación química, pero se prepara de forma alternativa mediante purificación de un análogo recombinante o destoxificado genéticamente de la toxina (por ejemplo, como se describe en el documento EP 209281). "Toxoide tetánico" también abarca fragmentos inmunogénicos de la proteína de longitud completa (por ejemplo Fragmento C – véase el documento EP 478602).

30 Los procedimientos para preparar toxoide de difteria (TD) también se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, TD se produce preferentemente mediante purificación de la toxina a partir de un cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* seguido por destoxificación química, pero se prepara de forma alternativa mediante purificación de un análogo recombinante o destoxificado genéticamente de la toxina (por ejemplo, CRM197 u otros mutantes como se describe en los documento US 4.709.017, US 5.843.711, US 5.601.827 y US 5.917.017).

35 En la técnica se conocen bien los componentes de pertusis acelulares (Pa). Los ejemplos incluyen toxoide de pertusis (TP), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN) y los aglutinógenos 2 y 3. Estos antígenos se purifican parcialmente o en grado elevado. Preferentemente se usan 2 o más componentes de pertusis acelulares en la vacuna. Más preferentemente, 2, 3, 4 o los 5 componentes de pertusis acelulares del ejemplo anterior se incluyen en la vacuna. Más preferentemente se incluyen TP, FHA y PRN. TP se puede producir mediante una diversidad de maneras, por ejemplo mediante purificación de la toxina a partir de un cultivo de *B. pertussis* seguido por destoxificación química o como alternativa mediante purificación de un análogo destoxificado genéticamente de TP (por ejemplo, como se describe en el documento US 5.085.862).

40 Los procedimientos para preparar *Bordetella pertussis* muerta de célula completa (Pw) adecuada para la presente invención se divulgan en el documento WO 93/24148, ya que son procedimientos de formulación adecuados para producir vacunas DT-TT-Pw-HepB y DT-TT-Pa-HepB.

45 Los conjugados de polisacárido capsular bacteriano pueden comprender cualquier péptido, polipéptido o proteína portadora que comprende al menos un epítipo T auxiliar. Preferentemente la proteína o proteínas portadoras usadas se seleccionan entre el grupo que comprende: toxoide tetánico, toxoide de difteria, CRM197, toxina de difteria recombinante (como se describe en cualquiera de los documentos 4.709.017, WO 93/25210, WO 95/33481, o WO 00/48638), neumolisina (preferentemente destoxificada químicamente o un mutante destoxificado) a partir de *S. pneumoniae*, OMPC de *N. meningitidis* y proteína D (PD) de *H. influenzae* (documento EP 594610). Debido al efecto conocido de la supresión de portador, es provechoso si en cada una de las composiciones de la invención los antígenos de polisacárido contenidos en la misma (antígenos "n") se conjugan a más de un portador. Por tanto (n-1) de los polisacáridos se podrían portar (por separado) en un tipo de portador y 1 en un portador diferente o (n-2) en uno y 2 en dos portadores diferentes, etc. Por ejemplo, en una vacuna que contiene 4 conjugados de polisacáridos bacterianos, 1, 2 o los cuatro se podrían conjugar a portadores diferentes). Sin embargo, la proteína D se usa provechosamente como un portador en las composiciones de la invención ya que la misma se puede usar para diversos polisacáridos (2, 3, 4 o más) en una composición sin un efecto de supresión de portador marcado. Más preferentemente Hib está presente como un conjugado de TT y MenA, MenC, MenY y MenW son conjugados de TT o PD. La proteína D también es un portador útil ya que proporciona un antígeno adicional que puede proporcionar

protección frente a *H. influenzae*.

El polisacárido se puede enlazar a la proteína portadora mediante cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, por Likhite, Patente de los Estados Unidos 4.372.945 y Armor y col, Patente de los Estados Unidos 4.474.757). Preferentemente, se lleva a cabo conjugación de CDAP (documento WO 95/08348).

5 En CDAP, el reactivo cianilante tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridinio (CDAP) se usa preferentemente para la síntesis de conjugados de polisacárido-proteína. La reacción de cianilación se puede realizar en condiciones relativamente suaves, lo cual evita la hidrólisis de los polisacáridos sensibles alcalinos. Esta síntesis permite el acoplamiento directo a una proteína portadora.

10 La composición inmunogénica anterior puede comprender además uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete componentes seleccionados entre la siguiente lista: polisacárido de tipo Y de *N. meningitidis* [MenY] (preferentemente conjugado), polisacárido de tipo W de *N. meningitidis* [MenW] (preferentemente conjugado), el polisacárido Vi de *Salmonella typhi*, vesículas de membrana exterior de *N. meningitidis* (preferentemente de serotipo B), una o más proteínas de membrana exterior (expuesta en superficie) de *N. meningitidis* (preferentemente de serotipo B), virus muerto atenuado de Hepatitis A (HepA - preferentemente el producto conocido como "Havrix™" [SmithKline Beecham Biologicals]) y virus de polio inactivado (IPV - preferentemente que comprende los tipos 1, 2 y 3 como es convencional en la técnica de vacunas, más preferentemente la vacuna de polio Salk) sin problemas de interferencia sustanciales para cualquiera de los antígenos de la composición.

20 Las composiciones inmunogénicas de la invención preferentemente se formulan como una vacuna para administración *in vivo* al huésped de una forma tal que los componentes individuales de la composición se formulan de forma que la inmunogenicidad de componentes individuales no esté deteriorada sustancialmente por otros componentes individuales de la composición. No deteriorada sustancialmente significa que tras la inmunización, se obtiene un título de anticuerpos frente a cada componente que es más del 60 %, preferentemente más del 70 %, más preferentemente más del 80 %, aún más preferentemente más del 90 % y lo más preferente es que sea más del 95-100 % del título obtenido cuando el antígeno se administra aislado.

25 Las composiciones inmunogénicas de la invención preferentemente se formulan como una vacuna para administración *in vivo* al huésped, de forma que las mismas confieren un título de anticuerpo superior al criterio de seroprotección de cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Este es un ensayo importante en la evaluación de la eficacia de una vacuna en la población. Los antígenos con un título de anticuerpo asociado por encima del cual se considera que un huésped se seroconvierte frente al antígeno se conocen bien y tales títulos se publican por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertida, más preferentemente más del 90 %, aún más preferentemente más del 93 % y lo más preferente es que sea del 96-100 %.

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

40 Una composición de DTPw particularmente preferida de la divulgación comprende: TT, TD, Pw, HepB (preferentemente adsorbida en fosfato de aluminio), Hib (conjugado preferentemente en TT y/o no adsorbido), MenA (preferentemente conjugado en proteínas D) y MenC (preferentemente conjugado en proteína D). Preferentemente la vacuna se puede suministrar en 2 recipientes, conteniendo el primero DTPw-HepB en una forma líquida y un segundo que contiene Hib-MenA-MenC en una forma liofilizada. El contenido de los recipientes se puede mezclar de forma improvisada antes de administrarlo a un huésped en una inyección única.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una composición inmunogénica o vacuna como se describe en el presente documento para su uso en un medicamento.

45 En un aspecto adicional de la divulgación se proporciona un uso de las composiciones inmunogénicas de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, Hepatitis B virus, *Haemophilus influenzae* y *N. meningitidis*.

50 Adicionalmente, también se proporciona un procedimiento para inmunizar un huésped humano frente a enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus de la Hepatitis B, *Haemophilus influenzae* y *N. meningitidis*, procedimiento que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica de la invención.

55 Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un mamífero susceptible a infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de la vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea o a través de la administración mucosal a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta

inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que se esté empleando y cómo se presente el mismo. En general, se espera que cada dosis comprenda 0,1-100 µg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 µg, preferentemente 0,1-10 µg, de los cuales de 1 a 5 µg es el intervalo más preferible.

- 5 El contenido de antígenos de proteína en la vacuna normalmente estará en el intervalo de 1-100 µg, preferentemente 5-50 µg, más normalmente en el intervalo de 5-25 µg.

A continuación de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

- 10 La preparación de vacuna se describe de forma general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton, Patente de los Estados Unidos 4.235.877.

- 15 Resulta interesante el hecho de que los inventores también hayan observado que para vacunas que comprenden TT, DT, Pw y Hib, se puede usar de forma sorprendente una dosis sustancialmente menor de Hib en la vacuna de combinación (en comparación con la dosis convencional de 10 µg por dosis de 0,5 ml) para obtener al menos títulos de anticuerpo equivalentes frente al antígeno de polisacárido capsular de tipo b de *H. influenzae*. Esto es contrario a lo que se hubiera esperado.

- 20 Por consiguiente, en una realización adicional de la divulgación se proporciona una composición inmunogénica multivalente que comprende *Bordetella pertussis* de célula completa muerta (Pw), toxoide tetánico (TT), toxoide de difteria (TD) y un conjugado de una proteína portadora y el polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B (Hib-preferentemente conjugada a TT, TD o CRM197), en la que la cantidad de conjugado por dosis de 0,5 ml de vacuna a granel es 1-8 µg y la inmunogenicidad del conjugado es equivalente o está mejorada con respecto a tales composiciones que comprenden cantidades mayores de conjugado. Opcionalmente, también se puede incluir antígeno de superficie de Hepatitis B.

- 25 Preferentemente la cantidad de conjugado por dosis de 0,5 ml de vacuna a granel es menos de 10 µg (de polisacárido en el conjugado), más preferentemente 1-7 ó 2-6 µg y más preferentemente aproximadamente 2,5, 3, 4 ó 5 µg. Más preferentemente el conjugado de Hib no se adsorbe en sal de adyuvante de aluminio antes de mezclarse con la vacuna de DTPw.

- 30 Una observación adicional que los inventores han realizado es el hecho de que las vacunas de combinación que comprenden un conjugado de Hib provocan títulos de anticuerpo anti-Hib significativamente más elevados en un huésped (en comparación con una vacuna de conjugado de Hib no adsorbida monovalente) si el conjugado de Hib se administra en una vacuna que comprende adicionalmente 1, pero particularmente 2 o más polisacáridos bacterianos y todos los polisacáridos de la vacuna no están adsorbidos en un adyuvante (particularmente sales de aluminio).

- 35 Un aspecto independiente adicional de la invención es, por lo tanto, proporcionar una composición inmunogénica multivalente que comprende un conjugado de una proteína portadora y el polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B (Hib), en el que dicha composición comprende adicionalmente 1, pero particularmente 2 o más polisacáridos bacterianos adicionales (preferentemente más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13) capaces de conferir protección a un huésped frente a infección por las bacterias a partir de las cuales derivan y en el que el polisacárido de Hib (y preferentemente ninguno de dichos polisacáridos) en la composición se adsorben en una sal de adyuvante de aluminio. Más preferentemente no existe sal de adyuvante de aluminio presente en la composición.

Que un antígeno no está "adsorbido sobre una sal de adyuvante de aluminio" significa que no está implicada una etapa expés o de adsorción exclusiva para el antígeno en sal de adyuvante de aluminio fresca en el procedimiento de formulación de la composición.

- 45 Hib se puede conjugar a cualquier portador que pueda proporcionar al menos un epítipo T auxiliar (ejemplos de los cuales se han descrito anteriormente) y preferentemente toxoide tetánico.

- 50 Preferentemente, los polisacáridos bacterianos adicionales también se conjugan a una proteína transportadora (ejemplos de las cuales se han descrito anteriormente). En realizaciones específicas el polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B y los polisacáridos adicionales no se conjugan al mismo portador (Hib y ninguno de los polisacáridos adicionales comparten al mismo portador), particularmente cuando el portador es CRM197. En las realizaciones preferidas de los ejemplos al menos uno de los polisacáridos de la composición se conjuga en proteína D, sin embargo esto no es esencial para la ejecución de la invención, de hecho ni Hib ni cualquiera de los polisacáridos adicionales tienen que estar conjugados en proteínas D.

- 55 En una realización específica de la invención anterior, únicamente Hib y los polisacáridos bacterianos adicionales (y conjugados de los mismos) son los únicos antígenos presentes en la composición.

Una cantidad de polisacárido que es capaz de conferir protección a un huésped (una cantidad eficaz) la puede determinar fácilmente el experto. En general, se espera que cada dosis comprenda 0,1-100 µg de polisacárido, preferentemente 0,1-50 µg, preferentemente 0,1-10 µg, de los cuales de 1 a 5 µg es el intervalo más preferible. El conjugado de Hib está presente preferentemente en una cantidad de 3-15 µg (de polisacárido en el conjugado), más preferentemente 4-12 µg y lo más preferentemente de 5-10 µg. En una realización preferida está presente un total de no menos de 2 µg de polisacárido adicional (particularmente cuando está conjugado) en la composición por dosis de 0,5 ml y preferentemente se incluyen no menos de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 µg. Preferentemente se incluyen no más de 100 µg de polisacárido adicional por dosis de 0,5 ml.

Preferentemente los polisacáridos bacterianos adicionales se seleccionan entre un grupo que consiste en: polisacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), polisacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC), polisacárido capsular de serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY), polisacárido capsular de serogrupo W de *N. meningitidis* (MenW), polisacárido capsular de grupo I de Estreptococos de grupo B, polisacárido capsular de grupo II de Estreptococos de grupo B, polisacárido capsular de grupo III de Estreptococos de grupo B, polisacárido capsular de grupo IV de Estreptococos de grupo B, polisacárido capsular de grupo V de Estreptococos de grupo B, polisacárido capsular de tipo 5 de *Staphylococcus aureus*, polisacárido capsular de tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, polisacárido Vi de *Salmonella typhi*, LPS de *N. meningitidis*, LPS de *M. catarrhalis* y LPS de *H. influenzae*. LPS significa cualquier lipo-polisacárido nativo (o lipo-oligosacárido) o lipo-polisacárido en el que la parte de lípido A se ha destoxificado mediante cualquiera de varios procedimientos conocidos (véanse por ejemplo los documentos WO 97/18837 o WO 98/33923), o cualquier molécula que comprende el polisacárido-O obtenido a partir de dicho LPS. LPS de *N. meningitidis* significa uno o más de los 12 inmunotipos conocidos (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11 y L12).

Combinaciones particularmente preferidas son composiciones que contienen o comprenden: 1) Hib conjugado, MenA conjugado y MenC conjugado; 2) Hib conjugada, MenY conjugado y MenC conjugado; y 3) Hib conjugada y MenC conjugado. La cantidad de PS en cada uno de los conjugados anteriores puede ser 5 ó 10 µg cada uno por dosis humana de 0,5 ml. Opcionalmente, las composiciones anteriores también pueden incluir vesículas de membrana exterior de serotipo B de *N. meningitidis* o una o más proteínas de membrana exterior (expuestas en superficie) de serotipo B de *N. meningitidis* o uno o más LPS de *N. meningitidis* (como se ha definido anteriormente) para preparar una vacuna de meningitis global. Preferentemente MenA, MenC y MenY son conjugados de TT o PD.

Los polisacáridos bacterianos adicionales también se pueden seleccionar entre cualquiera de los polisacáridos neumocócicos (preferentemente más de 7, más preferentemente 11 o más y más preferentemente 13 o más) tales como entre serotipo: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 20, 22F, 23F o 33F. Preferentemente los polisacáridos neumocócicos son conjugados (más preferentemente conjugados de PD).

Por ejemplo los polisacáridos neumocócicos obtenidos a partir de al menos cuatro serotipos (incluyendo 6B, 14, 19F y 23F por ejemplo) o a partir de al menos 7 serotipos (incluyendo 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F por ejemplo) se pueden seleccionar a partir de la lista anterior. Más preferentemente se incluyen polisacáridos de más de 7 serotipos en la composición, por ejemplo al menos 11 serotipos. Por ejemplo la composición en una realización incluye 11 polisacáridos capsulares obtenidos a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (preferentemente conjugados). En una realización preferida de la invención se incluyen al menos 13 antígenos de polisacárido (preferentemente conjugados), aunque también se consideran por la invención antígenos de polisacárido adicionales, por ejemplo 23 valente (tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

Para la vacunación de personas mayores (por ejemplo, para la prevención de neumonía) es provechoso incluir serotipos 8 y 12F (y más preferentemente 15 y 22 también) en la composición antigénica 11 valente preferida descrita anteriormente para formar una vacuna 13/15 valente, mientras que para bebés o niños pequeños (en los que la otitis media es más preocupante) se incluyen provechosamente los serotipos 6A y 19A para formar una vacuna 13 valente.

Los polisacáridos neumocócicos pueden o no estar adsorbidos en sales de adyuvante de aluminio.

Hib (preferentemente liofilizada) y los polisacáridos neumocócicos (preferentemente en una forma líquida) se pueden mezclar de forma improvisada antes de administrarlos a un huésped en una administración/inyección única. Con una formulación de este tipo es posible, tras la inmunización, obtener títulos de anticuerpo frente a polisacárido capsular de Hib de más del 100 % del título obtenido cuando el conjugado de Hib se administra en aislamiento. En realizaciones preferidas, no se produce un efecto perjudicial (significativamente) en los conjugados de polisacárido neumocócico (en términos de eficacia protectora) en la combinación en comparación con su administración en aislamiento. Esto se puede evaluar en términos de la medición de la media geométrica de concentraciones (CMG) post-primarias de anticuerpo anti-polisacárido un mes después de la última dosis primaria (siendo las dosis primarias las administraciones de sensibilización - habitualmente 3 - en el primer año de vida). Las CMG (en µg/l) para una vacuna de la invención deben estar preferentemente por encima del 55 % (más preferentemente por encima del 60, 70, 80 o el 90 %) de la CMG cuando los polisacáridos neumocócicos se administran sin el conjugado de Hib. Otro indicio de que no ha ocurrido un efecto perjudicial es si el % de sujetos con concentraciones de anticuerpo de no menos de 0,5 µg/l difiere en no más del 10 % (preferentemente menos del 9, el 7, el 5, el 3 o el 1 %) en comparación

con administraciones post-primarias de 1 mes de la vacuna de la invención frente a la vacuna sin el conjugado de Hib.

5 Aunque lo anterior se refiere a Hib y “polisacáridos” bacterianos adicionales (la realización preferida) se prevé que la invención se puede extender a Hib y “oligosacáridos” bacterianos adicionales (los cuales de forma natural tienen un número bajo de unidades de repetición o que son polisacáridos con un tamaño reducido para manejabilidad, pero que aún son capaces de inducir una respuesta inmunoprotectora en un huésped) que se conocen bien en la técnica de vacunas.

10 Preferentemente, la composición inmunogénica multivalente de este aspecto de la invención se formula como una vacuna para administración *in vivo* al huésped en la que los componentes individuales de la composición se formulan de forma que la inmunogenicidad de componentes individuales no esté alterada por otros componentes individuales de la composición (véase la definición anterior). Por tanto, en realizaciones preferidas, no ocurre un efecto perjudicial (significativamente) a los polisacáridos bacterianos adicionales (en términos de eficacia protectora) en la combinación en comparación con su administración en aislamiento.

15 Preferentemente, la composición inmunogénica multivalente de este aspecto de la invención se formula como una vacuna para administración *in vivo* al huésped, que confiere un título de anticuerpo superior al criterio de seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos (véase la definición anterior).

20 Las composiciones de este aspecto de la invención se formulan preferentemente en una vacuna. El uso de la composición inmunogénica multivalente de este aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por infección por *Haemophilus influenzae* (y preferentemente también aquellos organismos a partir de los cuales se obtienen los polisacáridos bacterianos adicionales) también se prevé, ya que es un procedimiento de inmunización de huésped humano frente a enfermedad causada por *Haemophilus influenzae* (y preferentemente también aquellos organismos a partir de los cuales se obtienen los polisacáridos bacterianos adicionales), procedimiento que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica multivalente de este aspecto de la invención.

25 También se proporciona un procedimiento para preparar la composición inmunogénica multivalente de este aspecto de la invención, que comprende la etapa de mezclar los componentes individuales entre sí. Si los polisacáridos bacterianos adicionales se tienen que adsorber sobre una sal de adyuvante de aluminio, esto se debe realizar antes de que se añada Hib a la formulación. Preferentemente no se debe usar un exceso de sal de adyuvante de aluminio. Más preferentemente el Hib se debe añadir al polisacárido adicional tratado con adyuvante de aluminio de forma improvisada a la composición que se está administrando a un huésped.

Ejemplos

Se proporcionan ejemplos únicamente con los fines de ilustración y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

35 **Ejemplo 1: Preparación de una vacuna de TD-TT-Pw-HepB (DTPw-HepB)**

Esto se realizó como se ha descrito en el documento WO 93/24148. La vacuna está disponible en el mercado con el nombre Tritanrix-HepB™ (SmithKline Beecham Biologicals).

Ejemplo 2: Preparación de vacunas de MenA-MenC-Hib (MenAC-Hib)

i) MenC-Hib o MenA-MenC-Hib sin adyuvante

40 MenAC-Hib: polisacárido capsular de tipo A de *N. meningitidis* conjugado en proteína D (usando la técnica de CDAP), polisacárido capsular de tipo C de *N. meningitidis* conjugado en proteína D y polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B conjugado en TT se mezclaron juntos en una cantidad de 5 µg de cada polisacárido en cada conjugado por dosis de 0,5 ml humana. El pH se ajustó a 6,1 y se liofilizó en presencia de sacarosa.

45 MenC-Hib: polisacárido capsular de tipo C de *N. meningitidis* conjugado en proteína D (usando la técnica de CDAP) y polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B conjugado en TT se mezclaron juntos en una cantidad de 5 µg de cada polisacárido en cada conjugado por dosis de 0,5 ml humana. El pH se ajustó a 6,1 y se liofilizó en presencia de sacarosa.

ii) MenA-MenC-Hib con adyuvante

50 Polisacárido capsular de tipo A de *N. meningitidis* conjugado en proteína D (usando las técnicas de CDAP), polisacárido capsular de tipo C de *N. meningitidis* conjugado en proteína D y polisacárido capsular de tipo B de *H. influenzae* conjugado en TT cada uno se adsorbió por separado en solución salina en fosfato de aluminio (5 µg de cada conjugado en 100 µg, 100 µg y 60 µg de Al³⁺, respectivamente, por dosis). Las vacunas adsorbidas se mezclaron juntas a un pH 6,1 y se liofilizaron en presencia de sacarosa.

Ejemplo 3: Ensayo clínico

El estudio de MenAC-Hib evaluó la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad inducidas por MenC-Hib y MenAC-Hib (adsorbido y no adsorbido) preparados mediante el ejemplo anterior suministrados como una vacunación primaria de tres dosis en bebés.

- 5 El estudio fue un estudio aleatorizado de fase II e incluyó cinco grupos de estudio. Las formulaciones que se evaluaron fueron una formulación liofilizada simple y adsorbida de Men AC-Hib y una formulación simple de MenC-Hib. Estas tres formulaciones se administraron a los tres primeros grupos de estudio de bebés a los 3, 4 y 5 meses de edad; se proporcionó Tritanrix-HepB™ simultáneamente (como una inyección separada) a estos tres grupos. La formulación simple de Men AC-Hib también se reconstituyó dentro de una vacuna combinada líquida de difteria, tétano, pertusis de células completas, hepatitis B (Tritanrix-HepB™) y se administró como una inyección única al
- 10 cuarto grupo de estudio de bebés a los 3, 4 y 5 meses de edad. Al quinto grupo (control) se administró vacuna Tritanrix-HepB™-Hib a los 3, 4 y 5 meses de edad. El estudio fue abierto, pero los dos primeros grupos que recibieron las dos formulaciones diferentes de MenAC-Hib eran doble ciego, así como los dos últimos grupos que recibieron las vacunas de Tritanrix-HepB™-MenAC-Hib y Tritanrix-HepB™-Hib. En resumen los grupos de estudio
- 15 fueron:

Grupo A	MertA _{5 μg} C _{5 μg} -Hib _{5 μg} + DTPw-HepB	N=80
Grupo B	MertA _{5 μg} C _{5 μg} -Hib _{5 μg} adsorbido + DTPw-HepB	N=80
Grupo C	MenC _{5 μg} -Hib _{5 μg} + DTPw-HepB	N=80
Grupo D	DTPw-HepB/MenA _{5 μg} C _{5 μg} -Hib _{5 μg}	N=80
Grupo E	DTPw-HepB/MenA _{5 μg} C _{5 μg} -Hiberix	N=80

- Los resultados mostraron que cada formulación que se evaluó indujo una buena respuesta inmune frente a cada antígeno (se midieron anticuerpos frente a los grupos meningocócicos A y C, Poli-Ribosil-Fosfato (el polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo b), toxoide de Difteria, toxoide Tetánico, *Bordetella pertusis* y hepatitis B). Cada
- 20 formulación de vacuna se toleró bien.

Anti Poli-Ribosil-Fosfato (PRP) Post III

Grupo	≥ 0,15 mcg/ml % [L.L.-U.L.]	≥ 1,0 mcg/ml % [L.L.-U.L.]	CMG (mcg/ml) [L.L.-U.L.]
MenAC-Hib N=67	98,5 [92,0-100,0]	98,5 [92,0-100,0]	19,0 [13,7-26,3]
MenAC-Hib_ads N=71	100,0 [94,9-100,0]	90,1 [80,7-95,9]	7,6 [5,6-10,7]
MenC-Hib N=66	100,0 [94,6-100,0]	95,5 [87,3-99,1]	12,6 [9,2-17,2]
DTPw-HepB /MenAC-Hib N=67	98,5 [92,0-100,0]	94,0 [85,4-98,3]	8,7 [6,2-12,2]
DTPw-HepB/Hiberix N=69	98,6 [92,2-100,0]	92,8 [83,9-97,6]	7,5 [5,5-11,3]

- 0,15 y 1,0 mcg/ml son umbrales de título típicos que se observan para estimar la seroprotección. No existe interferencia de Hib en la vacuna de DTPw-HepB /MenAC-Hib. Esto también se puede observar en la Fig. 1 que muestra la curva acumulativa inversa (CAI) de los datos. Además, es sorprendente que la vacuna de MenAC-Hib no adsorbida mostró un título anti PRP significativamente más elevado en comparación con la formulación adsorbida.
- 25

Anti IgG de Proteína D Post III

Grupo	≥ 100 ELU/ml % [L.L.-U.L.]	CMG (ELU/ml) [L.L.-U.L.]
MenAC-Hib N=64	96,9 [89,2-99,6]	842 [662-1072]
MenAC-Hib_ads N=66	100,0 [94,6-100,0]	1480 [1195-1831]
MenC-Hib N=63	95,2 [86,7-99,0]	550 [426-709]
DTPw-HepB /MenAC-Hib N=63	100 [94,3-100,0]	1815 [1411-2335]
DTPw-HepB/Hiberix N= 64	14,1 [6,6-25,0]	62,1 [54-72]

Véase también la Fig. 2 para las curvas CAI de anti-IgG de PD. Como se puede observar, todas las formulaciones indujeron una respuesta inmune hacia la proteína portadora (proteína D).

Anti IgG de PSA Post III (polisacárido capsular de meningococo A)

Grupo	≥ 0,3 mcg/ml % [L.L.-U.L.]	CMG (mcg/ml) [L.L.-U.L.]
MenAC-Hib N=52	100,0 [93,2-100,0]	7,4 [6,0-9,1]
MenAC-Hib_ads N=55	100,0 [93,5-100,0]	9,8 [7,9-12,2]
MenC-Hib N=39	17,9 [7,5-33,5]	0,22 [0,16-0,29]
DTPw-HepB /MenAC-Hib N=61	98,4 [91,2-100,0]	15,1 [11,5-19,9]
DTPw-HepB/Hiberix N=57	3,5 [0,4-12,1]	0,16 [0,14-0,18]

5

Este ensayo es un ensayo de ELISA que mide el contenido de IgG frente a polisacárido A meningocócico. La Fig. 3 muestra los gráficos de CAI de los datos. No existe interferencia del antígeno de polisacárido MenA para inducir al menos la misma cantidad de anticuerpos cuando está presente en una vacuna de DTPw-HepB /MenAC-Hib.

Anti SBA Post III frente a meningococo de serotipo A

Grupo	≥ 1:8 % [L.L.-U.L.]	TMG [L.L.-U.L.]
MenAC-Hib N=52	92,5 [79,6-98,4]	40,1 [26,2-61,4]
MenAC-Hib_ads N=44	90,9 [78,3-97,5]	40,6 [24,5-67,0]

10

(continuación)

MenC-Hib N=0	No realizado	No realizado
DTPw-HepB /MenAC-Hib N=50	92,5 [79,6-98,4]	67,7 [45,3-101,1]
DTPw-HepB/Hiberix N=57	0,0 [0,0-8,0]	0,16 [0,14-0,18]

Este ensayo es un ensayo bactericida que mide los anticuerpos bactericidas frente a serogrupo A de meningococo. No existe interferencia del antígeno de polisacárido MenA para inducir al menos la misma cantidad de anticuerpos cuando está presente en una vacuna de DTPw-HepB MenAC-Hib.

5 Post III anti IgG de PSC (polisacárido capsular de meningococo C) y SBA-MenC

Grupo	Anti-IgG de PSC		SBA-MenC	
	% ≥ 0,3 mcg/ml [L.L.-U.L.]	CMG [L.L.-U.L.]	% ≥ 1:8 [L.L.-U.L.]	TMG [L.L.-U.L.]
MenAC-Hib N=52/51	100,0 [93,2-100,0]	6,9 [5,7-8,2]	96,1 [86,5-99,5]	322,5 [208,7-498,5]
MenAC-Hib_ads N=55/57	100,0 [93,5-100,0]	10,4 [8,6-12,7]	86,0 [74,2-93,7]	144,6 [87,1-239,8]
MenC-Hib N=40/37	100,0 [91,2-100,0]	6,4 [5,2-7,9]	97,3 [85,8-99,9]	270,8 [167,7-437,3]
DTPw-HepB/MenAC-Hib N=61/61	100,0 [94,1-100,0]	12,1 [10,2-14,4]	91,8 [81,9-97,3]	394,2 [244,8-634,9]
DTPw-HepB/Hiberix N= 57/59	3,5 [0,4-12,1]	0,16 [0,14-0,18]	1,7 [0,0-9,1]	4,4 [3,6-5,3]

Este ensayo es un ensayo de ELISA que mide el contenido de IgG frente a polisacárido C meningocócico. La Fig. 4 muestra un gráfico de CAI de los datos. SBA-MenC es un ensayo bactericida que mide la actividad bactericida del suero frente a meningococo C. Es una medida de anticuerpos funcionales. La Fig. 5 muestra un gráfico de CAI de los datos. No existe interferencia del antígeno de polisacárido MenC para inducir la misma cantidad de anticuerpos funcionales cuando el mismo está presente en una vacuna de DTPw-HepB/MenAC-Hib.

10

SBA-MenC Post III frente a serogrupo C de meningococo

Grupo	SBA-MenC	
	% ≥ 1:8 [L.L.-U.L.]	TMG [L.L.-U.L.]
MenAC-Hib N=61	95,1 [86,3-99,0]	293,4 [195,6-440,3]
MenAC-Hib_ads N=67	85,1 [74,3-92,6]	151,4 [94,2-242,4]
MenC-Hib N=55	96,4 [87,5-99,6]	297,8 [201,4-440,4]

(continuación)

DTPw-HepB/MenAC-Hib N=61	93,4 [84,1-98,2]	426,9 [271,2-671,9]
DTPw-HepB/Hiberix N= 62	1,6 [0,0-8,7]	4,4 [3,7-5,2]

- 5 Este ensayo es un ensayo bactericida que mide los anticuerpos bactericidas frente a serogrupo A de meningococo. Es una medida de anticuerpos funcionales. No existe interferencia del antígeno de polisacárido MenC de inducir la misma cantidad de anticuerpos funcionales cuando el mismo está presente en una vacuna de DTPw-HepB/MenAC-Hib.

Índices de seroconversión de anticuerpos para difteria, tétanos, células de *B. pertussis* y HepB

Programa (3-4-5 meses)				
	D	T	BP	HepB
MenAC-Hib	98,5 [92,0-100]	98,5 [92,0-100]	95,5 [87,3-99,1]	92,5 [83,4-97,5]
DTPw-HepB/MenAC-Hib	98,5 [92,0-100,0]	100 [94,6-100]	97,0 [89,5-99,6]	97,0 [89,6-99,6]
DTPw-HepB/Hiberix	100 [94,8-100,0]	100 [94,7-100]	97,1 [89,8-99,6]	97,1 [89,9-99,6]

- 10 BP se refiere a *B. pertussis*. Se realizó un ensayo de ELISA midiendo IgG frente a las bacterias de células completas.

Título Medio Geométrico (TMG) de anticuerpos para difteria, tétanos, células de *B. pertussis* y HepB

Programa (3-4-5 meses)				
	D	T	BP	HepB
MenAC-Hib	2,02 [1,62-2,51]	2,18 [1,69-2,82]	74,9 [61,9-90,8]	357,5 [236,2-541,2]
DTPw-HepB/MenAC-Hib	1,69 [1,36-2,09]	2,42 [1,96-3,00]	71,6 [59,7-85,9]	380,2 [265,1-545,2]
DTPw-HepB/Hiberix	1,26 [1,03-1,53]	2,08 [1,67-2,59]	69,0 [58,2-81,8]	379,1 [265,0-542,2]

A partir de las dos tablas anteriores se observó que la respuesta inmune a TD, TT, Pw y HepB es similar a la obtenida con la vacuna registrada Tritanrax-HepB en términos tanto de seroconversión como de TMG.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica multivalente que comprende un conjugado de una proteína portadora y el polisacárido u oligosacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B en una dosis de 1-5 µg de polisacárido u oligosacárido, en la que dicha composición comprende además dos o más polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales capaces de conferir protección a un huésped frente a infección por las bacterias a partir de las cuales derivan y en la que el polisacárido de Hib y los 2 o más polisacáridos u oligosacáridos adicionales no están adsorbidos en un adyuvante.
2. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1, en la que los polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales se conjugan a una proteína portadora.
3. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1, en la que los 2 o más polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales incluyen polisacárido capsular de serogrupo A de *N. meningitidis* u oligosacárido conjugado a una proteína portadora y polisacárido u oligosacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis* conjugado a una proteína portadora.
4. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1, en la que los 2 o más polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales incluyen polisacárido u oligosacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis* conjugado a una proteína portadora y polisacárido u oligosacárido capsular de serogrupo Y de *N. meningitidis* conjugado a una proteína portadora.
5. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1 ó 2, que comprende más de 7 polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales.
6. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 5, en la que los polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales son polisacáridos u oligosacáridos capsulares neumocócicos.
7. Una composición inmunogénica multivalente que comprende in conjugado de una proteína portadora y el polisacárido u oligosacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B en una dosis de 1-5 µg de polisacárido u oligosacárido, en la que dicha composición comprende adicionalmente 1 o más polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales capaces de conferir protección a un huésped frente a infección por las bacterias a partir de las cuales derivan, en la que el 1 o más polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales incluyen polisacárido u oligosacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis* conjugado a una proteína portadora y en la que el polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B de y todo(s) el (los) polisacárido(s) u oligosacárido(s) no está(n) adsorbido(s) en un adyuvante.
8. La composición inmunogénica multivalente de las reivindicaciones 1-7, en la que los polisacáridos u oligosacáridos bacterianos adicionales se seleccionan entre un grupo que consiste en: polisacárido capsular de serogrupo A de *N. meningitidis*, polisacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis*, polisacárido capsular de serogrupo Y de *N. meningitidis*, polisacárido capsular de serogrupo W de *N. meningitidis*, polisacárido capsular de serotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 2 de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 3 de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 4 de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 5 de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 6A de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 6B de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 7F de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 9N de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 9V de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 10A de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 11A de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 12F de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 14 de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 15B de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 17F de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 18C de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 19A de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 19F de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 20 de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 22F de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 23F de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de serotipo 33F de *S. pneumoniae*, polisacárido capsular de grupo I de Estreptococos de Grupo B, polisacárido capsular de grupo II de Estreptococos de Grupo B, polisacárido capsular de grupo III de Estreptococos de Grupo B, polisacárido capsular de grupo IV de Estreptococos de Grupo B, polisacárido capsular de grupo V de Estreptococos de Grupo B, polisacárido capsular de tipo 5 de *Staphylococcus aureus*, polisacárido capsular de tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, polisacárido VI de *Salmonella typhi*, LPS de *N. meningitidis*, LPS de *M. catarrhalis* y LPS de *H. influenzae*, u oligosacáridos de los mismos.
9. La composición inmunogénica multivalente de las reivindicaciones 1-8, en la que la proteína o proteínas portadoras usadas se seleccionan entre el grupo que comprende: toxoide tetánico, toxoide de difteria, CRM197, toxina de difteria recombinante, OMPC de *N. meningitidis*, neumolisina de *S. pneumoniae* y proteína D de *H. influenzae*.
10. La composición inmunogénica multivalente de las reivindicaciones 1-9, en la que la proteína portadoras usada es toxoide tetánico.
11. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 9, en la que el polisacárido u oligosacárido

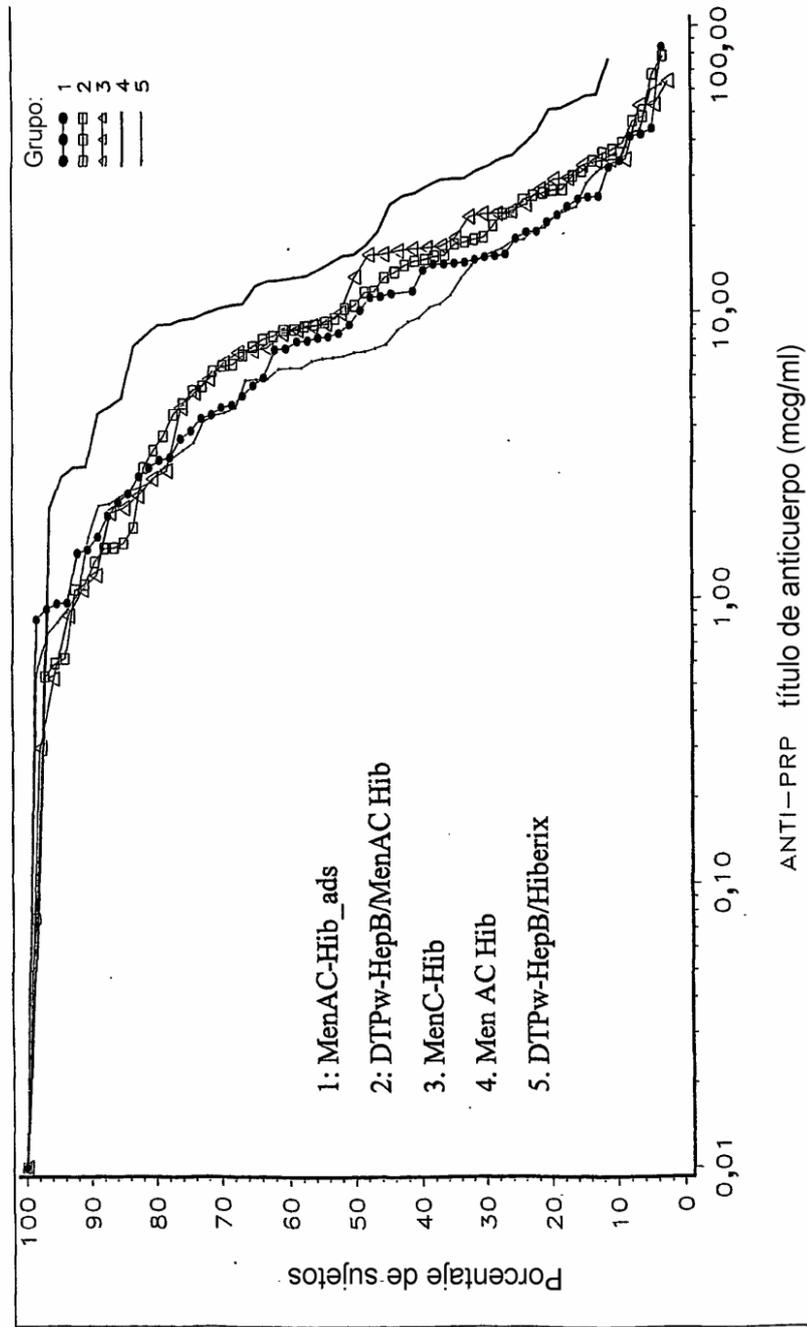
capsular de *H. influenzae* de tipo B y los polisacáridos u oligosacáridos adicionales no están conjugados al mismo portador.

- 5 12. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 11, en la que el polisacárido u oligosacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B y los polisacáridos u oligosacáridos adicionales no están todos conjugados a CRM197.
13. El uso de la composición inmunogénica multivalente de las reivindicaciones 1-12 en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de enfermedades causadas por infección por *Haemophilus influenzae*.
14. La composición inmunogénica multivalente de las reivindicaciones 1-12, para su uso en un medicamento.
- 10 15. Un procedimiento para preparar la composición inmunogénica multivalente de las reivindicaciones 1-12 que comprende la etapa de mezclar los componentes individuales en conjunto.

B45225

CAI de Anti-PRP Post-III

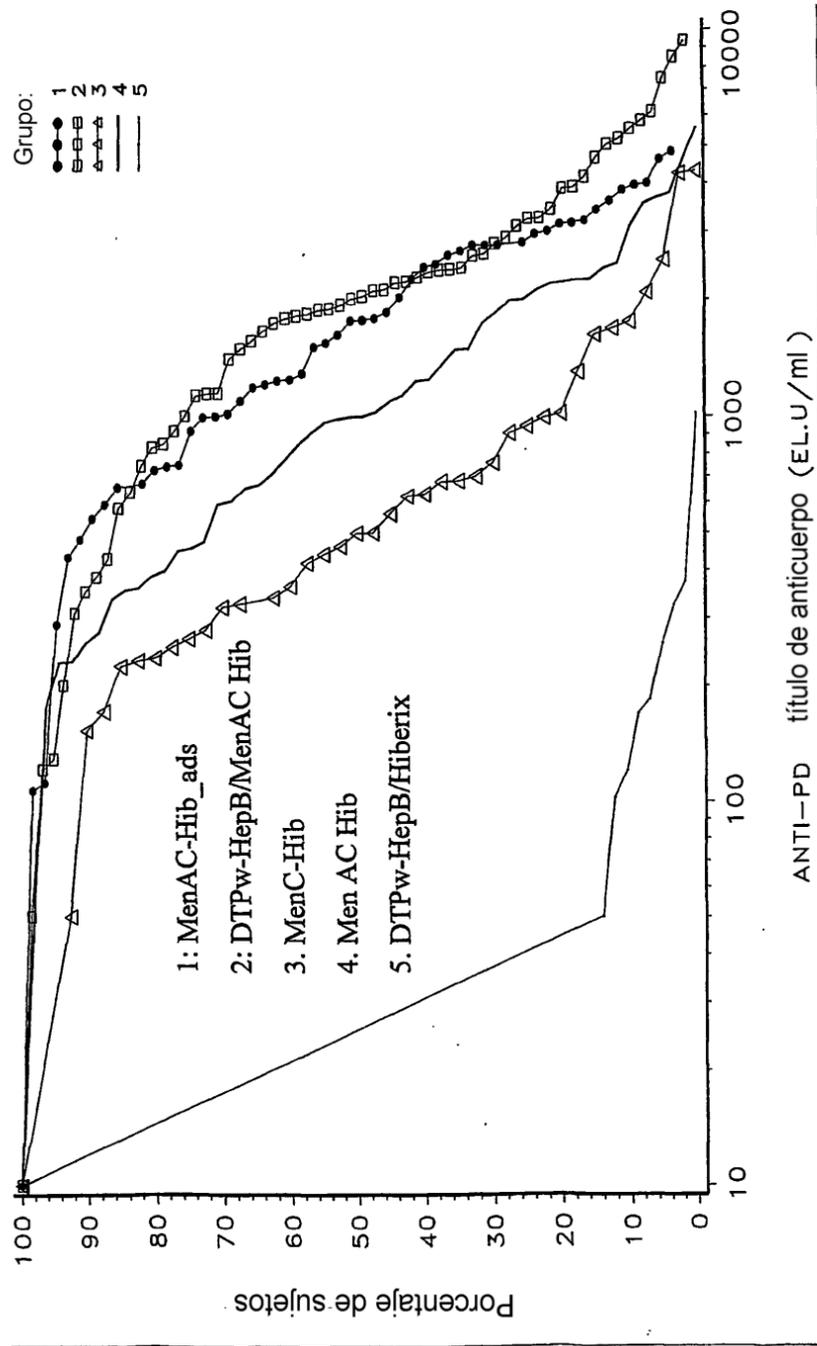
Figura 1



B45225

CAI de Anti-IgG de PD Post-III

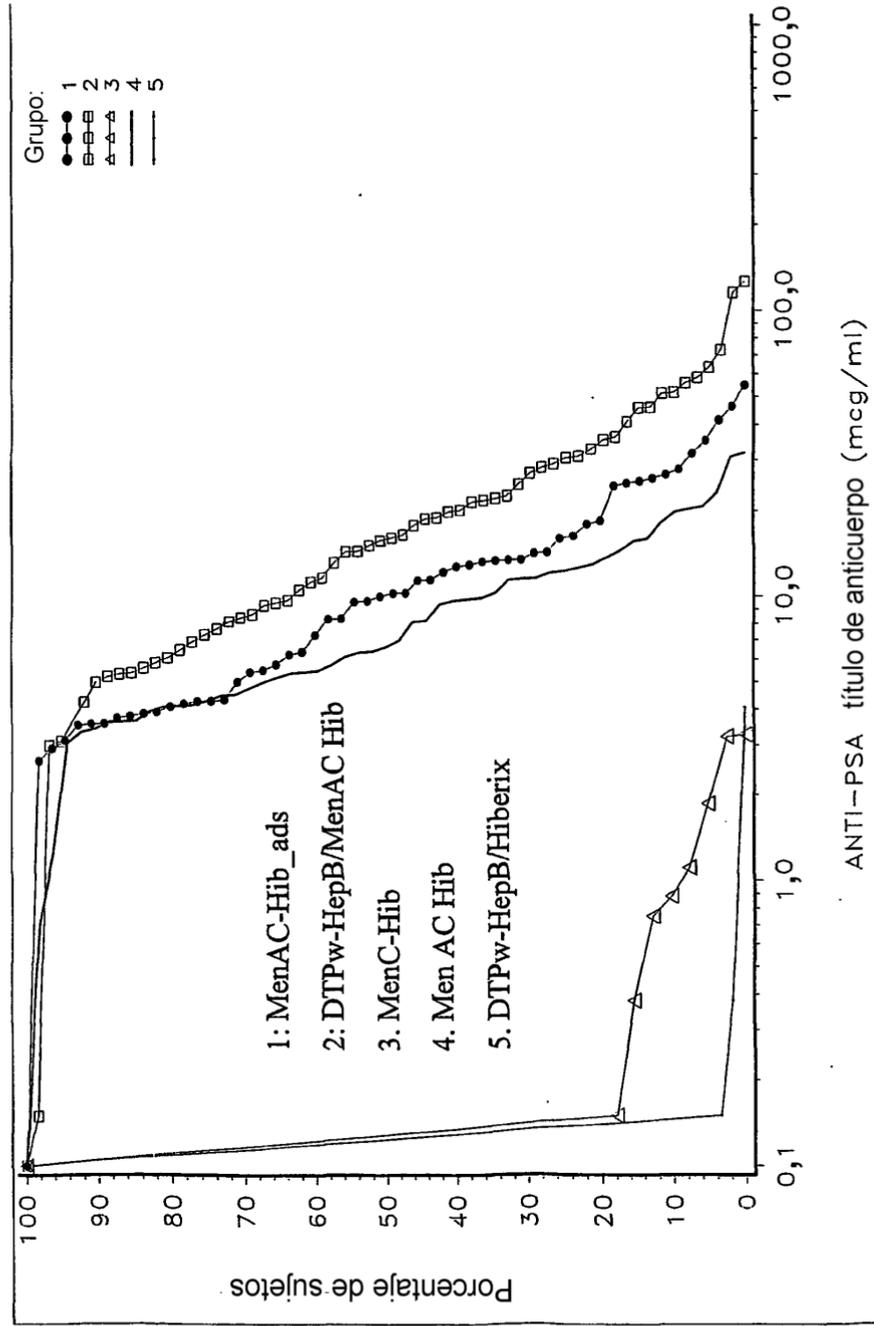
Figura 2



B45225

CAI de Anti-PSA Post-III

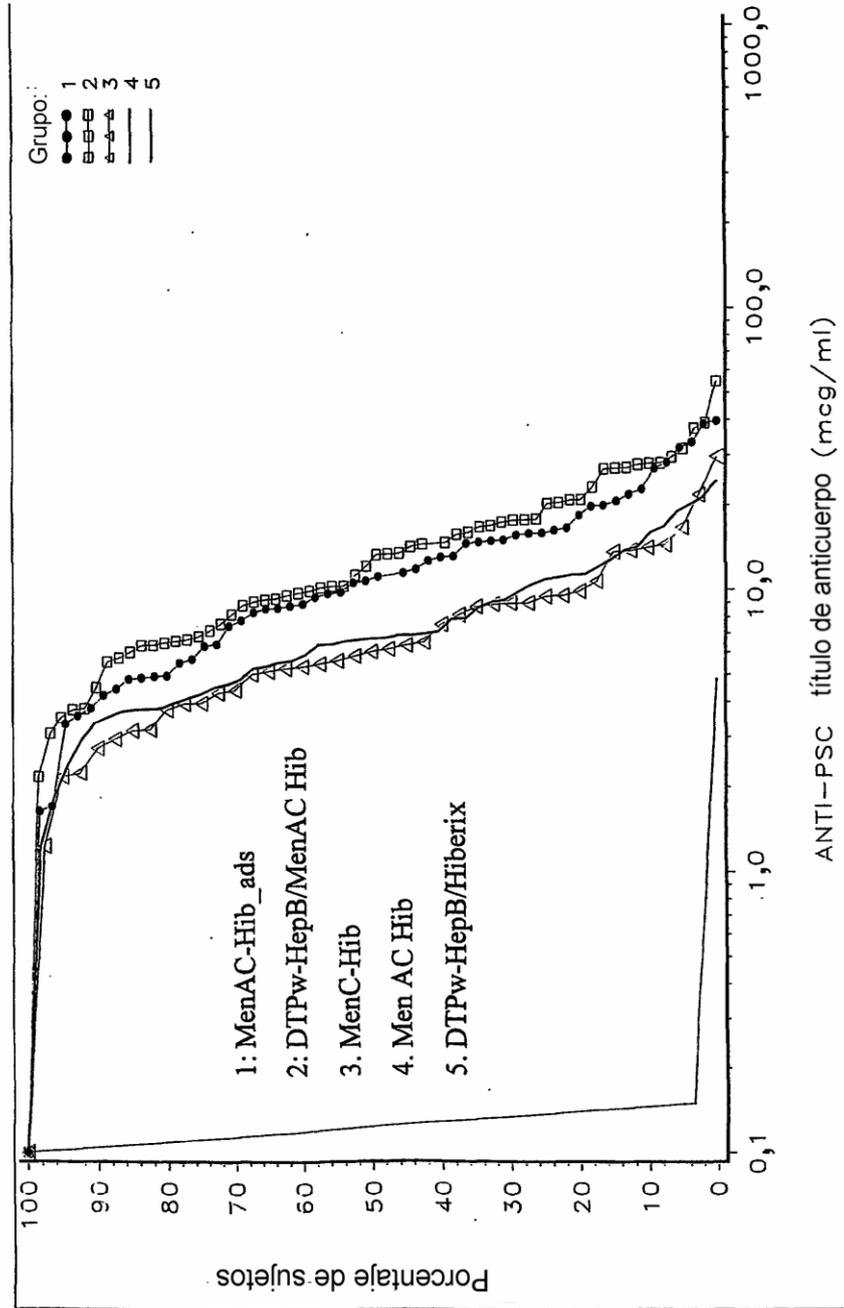
Figura 3



B45225

CAI de Anti-PSC Post-III

Figura 4



B45225

CAI de MenC SBA Post-III

Figura 5

