

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 075**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06754599 .6**
96 Fecha de presentación: **23.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1896063**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2008**

54 Título: **Composición inmunogénica**

30 Prioridad:
27.06.2005 GB 0513069
27.06.2005 GB 0513071
28.07.2005 GB 0515556
28.11.2005 GB 0524204
21.12.2005 GB 0526041
21.12.2005 GB 0526040

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

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

72 Inventor/es:
BIEMANS, Ralph L.;
BOUTRIAU, Dominique;
CAPIAU, Carine;
DENOEL, Philippe;
DUVIVIER, Pierre y
POOLMAN, Jan

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 075 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 inmunogénica.

5 La presente solicitud se refiere a composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden un conjugado de sacárido Hib y al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional combinado con antígeno o antígenos adicionales incluyendo pertussis de célula completa y/o antígeno de superficie de hepatitis B, procedimientos para preparar tales composiciones inmunogénicas y vacunas y usos y procedimientos de inmunización usando la composición inmunogénica y vacuna.

10 Los polisacáridos bacterianos han demostrado ser inmunógenos eficaces para su uso en vacunas, particularmente cuando se conjugan con una proteína transportadora. Están disponibles vacunas de conjugados comerciales frente a *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hibiter® Wyeth-Lederie), polisacáridos neumocócicos (Prevnar® -Wyeth-Lederie) y polisacáridos meningocócicos (Meningitec® - Wyeth-Lederie y Menactra®- Sanofi).

15 También se han descrito las composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden un conjugado de Hib, un conjugado de sacárido de *N. meningitidis*, pertussis de célula completa y/o antígeno de superficie de hepatitis B. Por ejemplo, el documento WO 02/00249 divulga una composición inmunogénica siete valente que comprende un toxoide de difteria, toxoide tetánico, pertussis de célula completa, antígeno de superficie de Hepatitis B, conjugado de Hib, conjugado de MenA y conjugado de MenC. Los resultados de ensayo clínico presentados usan una dosis de sacárido de 5 µg de cada uno de los conjugados de sacárido bacteriano. Adicionalmente el documento WO 2005/08794 describe vacunas de combinación con dosis bajas de conjugado de Hib.

20 La presente invención se refiere a la provisión de una vacuna de combinación que comprende un conjugado de Hib, un conjugado de sacárido bacteriano adicional (por ejemplo un conjugado de sacárido de *N. meningitidis*) y antígenos adicionales incluyendo uno o ambos de pertussis de célula completa y antígeno de superficie de Hepatitis B. Las dosis de sacárido usadas permiten que se genere una buena respuesta inmune frente a Hib y los sacáridos bacterianos adicionales así como también frente al componente de pertussis y/o el componente de antígeno de superficie de Hepatitis B.

25 Los inventores han observado de forma sorprendente que mediante la reducción de la dosis de sacárido de Hib y/o los conjugados bacterianos adicionales a por debajo de 5 µg por dosis, en una vacuna de combinación que comprende pertussis de célula completa y/o antígeno de superficie de Hepatitis B, se mantiene una buena respuesta inmune a los conjugados de sacárido y la inmunogenicidad de pertussis de célula completa y antígeno de superficie de Hepatitis B está potenciada (por ejemplo, de forma que la CMG de Pw y/o Hepatitis B medida mediante ELISA es mayor que el nivel conseguido después de la inmunización con una composición inmunogénica que contiene una dosis de sacárido de 5 µg de cada conjugado).

30 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de sacárido Hib, al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicionales y un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en pertussis de célula completa y antígeno de superficie de hepatitis B, en la que la dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib es menor de 5 µg por dosis.

Descripción detallada

35 La composición inmunogénica de la invención comprende un conjugado de sacárido Hib y/o al menos o exactamente uno, dos, tres o cuatro conjugados de sacárido bacteriano, por ejemplo conjugado o conjugados de *N. meningitidis* y un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en pertussis de célula completa y antígeno de superficie de hepatitis B, en la que la dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib es menor de 5 µg o menor de 4 µg o está entre 1-4 µg o 1-3 µg o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg y opcionalmente la dosis de sacárido del o de cada uno del al menos o exactamente uno, dos, tres o cuatro conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicionales (por ejemplo conjugado o conjugados de sacárido de *N. meningitidis*) es menor de 10 µg, 9 µg, 8 µg, 7 µg, 6 µg, 5 µg o 4 µg o entre 1-10 µg, 1-8 µg, 1-6 µg, 1-5 µg, 1-4 µg, 1-3 µg o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg.

40 El término "sacárido" incluye polisacáridos u oligosacáridos. Los polisacáridos se aíslan a partir de bacterias o se aíslan a partir de bacterias y se dimensionan hasta algún grado mediante procedimientos conocidos (véanse por ejemplo los documentos EP497524 y EP497525) y opcionalmente mediante microfluidización. Los polisacáridos se pueden dimensionar con el fin de reducir la viscosidad en muestras de polisacárido y/o para mejorar la filtrabilidad de productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un número bajo de unidades de repetición (típicamente 5-30 unidades de repetición) y son típicamente polisacáridos hidrolizados.

45 La "dosis de sacárido" se mide en la cantidad de composición inmunogénica o vacuna que se administra a un ser humano.

50 Un sacárido de Hib es el polisacárido u oligosacárido capsular polirribosil fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* de tipo b.

“Al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional” se refiere a un conjugado de cualquier sacárido bacteriano enlazado a una proteína transportadora. El sacárido bacteriano es opcionalmente un sacárido capsular obtenido a partir de una cepa de *N. meningitidis*, una cepa de *S. pneumoniae*, una cepa de *S. typhi* o cualquiera de los sacáridos bacterianos descritos en el presente documento.

5 “Al menos un conjugado o conjugados de sacárido de *N. meningitidis*” se refiere a sacárido capsular de serogrupo de A de *N. meningitidis* (MenA), sacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC), sacárido capsular de serogrupo W135 de *N. meningitidis* (MenW), sacárido capsular de serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY), sacárido capsular de serogrupo B de *N. meningitidis* (MenB), sacáridos capsulares de serogrupos C e Y (MenCY), sacáridos capsulares de serogrupos C y A (MenAC), sacáridos capsulares de serogrupos C y W135 (MenCW), sacáridos capsulares de serogrupos A e Y (MenAY), sacáridos capsulares de serogrupos A y W135 (MenAW), sacáridos capsulares de serogrupos W135 e Y (Men WY), sacáridos capsulares de serogrupos A, C y W135 (MenACW), sacáridos capsulares de serogrupos A, C e Y (MenACY): sacáridos capsulares de serogrupos A, W135 e Y (MenAWY), sacáridos capsulares de serogrupos C, W135 e Y (MenCWY); o sacáridos capsulares de serogrupos A, C, W135 e Y (MenACWY), sacáridos capsulares de serogrupos B y C (MenBC), sacáridos capsulares de serogrupos B, C e Y (MenBCY), sacáridos capsulares de serogrupos B, C y A (MenABC), sacáridos capsulares de serogrupos B, C y W (MenBCW), sacáridos capsulares de serogrupos A, B e Y (MenABY), sacáridos capsulares de serogrupos A, B y W (MenABW), sacáridos capsulares de serogrupos B, W135 e Y (MenBWY), sacáridos capsulares de serogrupos A, B, C y W135 (MenABCW), sacáridos capsulares de serogrupos A, B, C e Y (MenABCY); sacáridos capsulares de serogrupos A, B, W135 e Y (MenABWY), sacáridos capsulares de serogrupos B, C, W135 e Y (MenBCWY); o sacáridos capsulares de serogrupos A, B, C, W135 e Y (MenABCWY).

Por ejemplo, cualquiera de las combinaciones de conjugados de sacárido de *N. meningitidis* enumeradas anteriormente, con o sin la adición del conjugado de sacárido Hib, pueden estar presentes a una dosis de sacárido Menos de 5 µg o menos de 4 µg o 1-4 µg o 1-3 µg o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg.

25 “Alrededor de” o “aproximadamente” se definen como dentro del 10% más o menos de la cifra dada con los fines de la invención.

En una realización la dosis de sacárido de Hib puede ser la misma que, mayor que o menor que la dosis de sacárido del conjugado de sacárido de *N. meningitidis*. La dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib es por ejemplo el 100% o menos del 90%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de la media o dosis más baja de sacárido del al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicionales (por ejemplo *N. meningitidis*).
30 La dosis de sacárido del sacárido Hib está por ejemplo entre el 20% y el 60%, el 30% y el 60%, el 40% y el 60% o aproximadamente o exactamente el 50% de la dosis media o más baja de sacárido del al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicionales (por ejemplo *N. meningitidis*).

En una realización de la invención, la dosis del o de cada uno del al menos un sacárido bacteriano adicional (por ejemplo *N. meningitidis*) es la misma o aproximadamente la misma.

35 Los ejemplos de composiciones inmunogénicas de la invención son composiciones que consisten en o que comprenden:

Los ejemplos de composiciones inmunogénicas de la invención son composiciones que consisten en o que comprenden:

40 Conjugado de Hib y conjugado de MenA y conjugado de MenC, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido MenA es mayor que la dosis de sacárido MenC.

Conjugado de Hib y conjugado de MenC y conjugado de MenY, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido MenC es mayor que la dosis de sacárido MenY.

45 Conjugado de Hib y conjugado de MenC y conjugado de MenW, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido MenC es mayor que la dosis de sacárido MenW.

50 Conjugado de Hib y conjugado de MenA y conjugado de MenW, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido MenA es mayor que la dosis de sacárido MenW.

Conjugado de Hib y conjugado de MenA y conjugado de MenY, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido MenA es mayor que la dosis de sacárido MenY.

55 Conjugado de Hib y conjugado de MenW y conjugado de MenY, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:4:2, 1:2:4, 1:4:1, 1:1:4, 1:3:6, 1:1:3, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido MenY es mayor que la dosis de sacárido MenW.

- El "antígeno adicional" comprende uno o ambos de pertussis de célula completa (Pw) y antígeno de superficie de Hepatitis B (HepB). En una realización, el antígeno adicional comprende además toxoide de difteria (TD), toxoide tetánico (TT), pertussis acelular (Pa) y/o virus de polio (IPV). En una realización, el antígeno adicional comprende o consiste en TD, TT y Pw. En una realización, el antígeno adicional comprende o consiste en TD, TT, antígeno de pertussis (Pa o Pw) y HepB. En una realización, el antígeno adicional comprende o consiste de TD, TT, antígeno de pertussis (Pa o Pw), HepB e IPV.
- El Hib y/o el sacárido o sacáridos de *N. meningitidis* incluidos en las composiciones inmunogénicas de la invención se conjugan a una proteína transportadora tal como toxoide tetánico, fragmento C de toxoide tetánico, mutantes no tóxicos de toxina tetánica, toxoide de difteria, CRM187, otros mutantes no tóxicos de toxina de difteria [tales como CRM176, CRM 197, 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; supresión o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones divulgadas en los documentos US 4709017 o US 49507040; mutación de al menos uno o más restos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones divulgadas en los documentos US 5917017 o US 6455673; o el fragmento divulgado en el documento US 5843711], penumolisina pneumocócica, OMPC (proteína de membrana exterior meningocócica – extraída habitualmente a partir del serogrupo B de *N. meningitidis* – el documento EP0372501), péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668, EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores del crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanas de diversos antígenos obtenidos de patógeno (Falugi y col (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tales como proteína N19 (Baraldoi y col (2004) Infect Immun 72; 4884-7), proteína de superficie pneumocócica PspA (documento WO 02/091998), pneumolisina (Kuo y col (1995) Infect Immun 63; 2706-13), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxinas A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761) o Proteína D (documentos EP594610 y WO 00/56360).
- En una realización, la composición inmunogénica de la invención usa la misma proteína transportadora (seleccionada de forma independiente) en el conjugado de Hib y el al menos un conjugado o conjugados de sacárido de *N. meningitidis*, opcionalmente en el conjugado de Hib y cada uno de los conjugados de sacárido de *N. meningitidis* (opcionalmente en todos los conjugados de sacárido presentes en la composición inmunogénica).
- En una realización, la composición inmunogénica comprende opcionalmente un conjugado de sacárido Hib y conjugado de polisacárido MenA, un conjugado de sacárido Hib y conjugado de sacárido MenC, un conjugado de sacárido Hib y conjugado de sacárido MenW, un conjugado de sacárido Hib y conjugado de sacárido MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenA y MenC, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenA y MenW, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenA y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenC y MenW, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenC y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenA, MenC y MenW, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenA, MenC y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenA, MenW y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenC, MenW y MenY o un conjugado de sacárido Hib y conjugados de sacáridos de MenA, MenC, MenW y MenY.
- En una realización, una proteína transportadora única puede transportar más de un antígeno de sacárido (documento WO 04/083251). Por ejemplo, una proteína transportadora única se puede conjugar con Hib y MenA, Hib y MenC, Hib y MenW, Hib y MenY, MenA y MenC, MenA y MenW, MenA y MenY, MenC y MenW, MenC y MenY o Men W y MenY.
- En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende un sacárido de Hib conjugado con una proteína transportadora seleccionada entre el grupo que consiste en TT, TD, CRM197, fragmento C de TT y proteína D.
- Cuando la proteína transportadora es TT o un fragmento de la misma para Hib y el al menos un sacárido o sacáridos de *N. meningitidis*, la dosis total del transportador está entre 2,5-25 µg, 3-20 µg, 4-15 µg, 5-12,5 µg, 15-20 µg, 16-19 µg o 17-18 µg.
- En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos uno, dos, tres o cuatro sacáridos bacterianos de *N. meningitidis* conjugados a una proteína transportadora seleccionada entre el grupo que consiste en TT, TD, CRM197, fragmento C de TT y proteína D.
- La composición inmunogénica de la invención comprende opcionalmente un conjugado de sacárido Hib que tiene una proporción de Hib a proteína transportadora de entre 1:5 y 5:1; 1:2 y 2:1; 1:1 y 1:4; 1:2 y 1:3,5; o aproximadamente o exactamente 1:2,5 ó 1:3 (p/p).
- La composición inmunogénica de la invención comprende opcionalmente al menos un conjugado de sacárido meningocócico (por ejemplo MenA y/o MenC y/o MenW y/o MenY) que tiene una proporción de sacárido Men a proteína transportadora de entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 5:1, entre 1:0,5 y 1:2,5 o entre 1:1,25 y 1:2,5 (p/p).

La proporción de sacárido a proteína transportadora (p/p) en un conjugado se puede determinar usando el conjugado esterilizado. La cantidad de proteína se determina usando un ensayo de Lowry (por ejemplo Lowry y col (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 o Peterson y col Analytical Biochemistry 100, 201-220 (1979)) y la cantidad de sacárido se determina usando IPC-OES (plasma acoplado inductivamente-espectroscopía de emisión óptica) para MenA, ensayo DMAP para MenC y ensayo de Resorcinol para MenW y MenY (Monsigny y col (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención el sacárido Hib se conjuga a la proteína transportadora a través de un engarce, por ejemplo un engarce bifuncional. El engarce es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, teniendo por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo de ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos de ácido carboxílico reactivos. El engarce tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un engarce posible es ADH. Otros engarces 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 (documentos US4673574, US4808700) y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286).

Los conjugados de sacárido presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo el sacárido se puede acoplar a través de un engarce de tioéter. El procedimiento de conjugación puede depender de la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado de este modo se puede acoplar directamente o a través de un grupo espaciador (engarce) a un grupo amino en la proteína transportadora. Opcionalmente, el éster de cianato se acopla con hexano diamina o ADH y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína transportadora usando química de heteroligamiento que implica la formación del enlace de tioéter o se conjuga a la proteína transportadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC). Tales conjugados se describen en la solicitud publicada PCT WO 93/15760 de Uniformed Services University y los documentos WO 95/08348 y 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 engarce de carbonilo que se puede formar mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (Bethell y col J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Heam y col J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18) seguido por reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede implicar la reducción del extremo anomérico hasta un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional de la reacción del grupo hidroxilo primario del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermedio de CDI carbamato y el acoplamiento del intermedio de CDI carbamato con un grupo amino en una proteína.

Los conjugados también se pueden preparar mediante procedimiento de aminación reductora directa tales como los que se describen en el documento US 4365170 (Jennings) y el documento US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

Un procedimiento adicional implica el acoplamiento de un sacárido activado con bromuro de cianógeno (o CDAP) derivatizado con hidrazida de ácido adípico (ADH) a la proteína transportadora mediante condensación de carbodiimida (Chu C. y col Infect. Immunity, 1983 245 256), por ejemplo usando EDAC.

En una realización, un grupo hidroxilo en un sacárido se enlaza a un grupo amino o carboxílico en una proteína directamente o indirectamente (a través de un engarce). Cuando está presente un engarce, un grupo hidroxilo en un sacárido se enlaza opcionalmente a un grupo amino en un engarce, por ejemplo mediante el uso de conjugación de CDAP. Un grupo amino adicional en el engarce por ejemplo ADH, se puede conjugar a un grupo de ácido carboxílico en una proteína, por ejemplo usando química de carbodiimida, por ejemplo mediante el uso de EDAC. En una realización, el Hib o al menos un sacárido o sacáridos de *N. meningitidis* se conjugan al engarce en primer lugar antes de que el engarce se conjuga a la proteína transportadora.

En una realización, el sacárido de Hib, cuando está presente, se conjuga a la proteína transportadora usando CNBr o CDAP o una combinación de química de CDAP y química de carbodiimida (tal como EDAC) o una combinación de CNBr y química de carbodiimida, (tal como EDAC). Opcionalmente Hib se conjugado usando CNBr y química de carbodiimida (opcionalmente EDAC). Por ejemplo, se usa CNBr para unir el sacárido y el engarce y después se usa química de carbodiimida para unir el engarce a la proteína transportadora.

En una realización, al menos uno de al menos un sacárido o sacáridos de *N. meningitidis* se conjuga directamente a una proteína transportadora opcionalmente el sacárido o sacáridos de Men W y/o MenY y/o MenC y/o MenA se conjugan directamente a una proteína transportadora. Por ejemplo MenW; MenY; MenC; MenA; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC se unen directamente a la proteína transportadora. Opcionalmente al menos uno de al menos un sacárido o sacáridos de *N. meningitidis* se conjuga directamente mediante CDAP. Por ejemplo MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC se unen directamente a la proteína transportadora mediante CDAP (véanse los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094).

Opcionalmente la proporción de sacárido Men W y/o Y a proteína transportadora está entre 1:0,5 y 1:2 (p/p) o la proporción de sacárido MenC a proteína transportadora está entre 1:0,8 y 1:2 ó 1:1,25 y 1:1,5 ó 1:0,5 y 1:1 (p/p), especialmente cuando estos sacáridos se unen directamente a la proteína, opcionalmente usando CDAP.

5 En una realización, al menos un sacárido o sacáridos de *N. meningitidis* se conjuga la proteína transportadora a través de un engarce, por ejemplo, un engarce bifuncional. El engarce es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, teniendo por ejemplo, un grupo amino reactivo y un grupo de ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos de ácido carboxílico reactivos. El engarce tiene por ejemplo, entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un engarce posible es ADH.

10 En una realización, MenA; MenC; o MenA y MenC se conjugan a una proteína transportadora a través de un engarce.

15 En una realización, el sacárido de *N. meningitidis* se conjuga a una proteína transportadora a través de un engarce usando CDAP y EDAC. Por ejemplo, MenA; MenC; o MenA y MenC se conjugan a una proteína a través de un engarce (por ejemplo aquellos con dos grupos amino en sus extremos tales como ADH) usando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, CDAP se usa para conjugar para el sacárido a un engarce y EDAC se usa para conjugar el engarce a una proteína. Opcionalmente la conjugación a través del engarce da como resultado una proporción de sacárido a proteína transportadora de entre 1:0,5 y 1:6; 1:1 y 1:5 ó 1:2 y 1:4, para MenA; MenC; o MenA y MenC.

20 En una realización de la invención, la composición inmunogénica comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados a una proteína transportadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo o se dimensiona mediante un factor de hasta x1,5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9, x10 o x20. Por ejemplo, el tamaño promedio de al menos uno, dos, tres o cuatro o cada polisacárido de *N. meningitidis* está por encima de 50 kDa, 60 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa o 130 kDa.

25 "Polisacárido nativo" se refiere a un polisacárido que no se ha sometido a un procedimiento, cuyo fin es reducir el tamaño del polisacárido.

30 "Dimensionado mediante un factor hasta x2" significa que el polisacárido se somete a un procedimiento que tiene por objeto reducir el tamaño de polisacárido pero conservar un tamaño mayor de la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X3, x4, etc. se han de interpretar de la misma manera, es decir, el polisacárido se somete a un procedimiento que tiene por objeto reducir el tamaño del polisacárido pero conservar un tamaño mayor de un tercio, un cuarto, etc. del tamaño del polisacárido nativo respectivamente.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados a una proteína transportadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo.

35 En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados a una proteína transportadora, en la que al menos, uno, dos, tres o cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* se dimensiona mediante un factor de hasta x1,5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10.

40 En una realización, el tamaño medio de al menos uno, dos, tres, cuatro o cada polisacárido de *N. meningitidis* está entre 50 kDa y 1500 kDa, 50 kDa y 500 kDa, 50 kDa y 300 kDa, 101 kDa y 1500 kDa, 101 kDa y 500 kDa, 101 kDa y 300 kDa determinado mediante MALLS.

En una realización, el sacárido MenA, cuando está presente, tiene un peso molecular de 50-500 kDa, 50-100 kDa, 100-500 kDa, 55-90 kDa, 60-70 kDa o 70-80 kDa o 60-80 kDa determinado por MALLS.

En una realización, el sacárido MenC, cuando está presente, tiene un peso molecular de 100-200 kDa, 50-100 kDa, 100-150 kDa, 101-130 kDa, 150-210 kDa o 180-210 kDa determinado por MALLS.

45 En una realización, el sacárido MenY, cuando está presente, tiene un peso molecular de 60-190 kDa, 70-180 kDa, 80-170 kDa, 90-160 kDa, 100-150 kDa o 110-140 kDa, 50-100 kDa, 900-140 kDa, 140-170 kDa o 150-160 kDa determinado por MALLS

En una realización, el sacárido MenW, cuando está presente, tiene un peso molecular de 60-190 kDa, 70-180 kDa, 80-170 kDa, 90-160 kDa, 100-150 kDa, 110-140 kDa, 50-100 kDa o 120-140 kDa determinado por MALLS.

50 Los pesos moleculares del sacárido se refieren al peso molecular del polisacárido medido antes de la conjugación y se mide mediante MALLS.

En una realización los sacáridos de *N. meningitidis* son polisacáridos nativos o polisacáridos nativos que se han reducido de tamaño durante un procedimiento de extracción normal.

En una realización los sacáridos de *N. meningitidis* se dimensionan mediante escisión mecánica, por ejemplo mediante microfluidización o sonicación. La microfluidización y la sonicación tienen la ventaja de reducir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes lo suficiente para proporcionar un conjugado filtrable.

5 En una realización, la polidispersidad del sacárido es 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 ó 1-1,05 y después de la conjugación a una proteína transportadora, la polidispersidad del conjugado es 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 ó 1,5-2,0. Todas las mediciones de polidispersidad se hacen mediante MALLS.

10 Para el análisis MALLS de sacáridos meningocócicos, se pueden usar dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl TOSOH Bioscience) 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 provisto de un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo Wyatt Otilab DSP provisto de una celda P100 y un filtro rojo a 498 nm).

En una realización, el sacárido MenA, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de forma que al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o el 98% de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una posición. La O-acetilación está, por ejemplo, presente al menos en la posición O-3.

15 En una realización, el sacárido MenC, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de forma que al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o el 98% de las unidades de repetición de NeuNAc enlazadas a ($\alpha 2 \rightarrow 9$) están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está, por ejemplo presente en la posición O-7 y/u O-8.

20 En una realización, el sacárido MenW, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de forma que al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o el 98% de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente, por ejemplo en la posición O-7 y/u O-9.

En una realización, el sacárido MenY, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de forma que al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o el 98% de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente en la posición 7 y/o 9.

25 El porcentaje de O-acetilación se refiere al porcentaje de las unidades de repetición que contienen O-acetilación. Esto se puede medir en el sacárido antes del conjugado y/o después de la conjugación.

Un aspecto adicional de la invención es una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Opcionalmente, la composición inmunogénica o vacuna contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para potenciar la respuesta inmune al inmunógeno. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, sales de aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), mezclas de escualeno (SAF-1), muramil péptido, derivados de saponina, preparaciones de pared celular de micobacteria, monofosforil lípido A, derivados de ácido micólico, tensioactivos de copolímero de bloque no iónicos, Quit A, subunidad B de toxina de cólera, polifosfaceno y derivados y complejos inmunoestimuladores (ISCOM) tales como aquellos descritos por Takahashi y col. (1990) Nature 344: 873-875.

35 Para las combinaciones de HibMen descritas anteriormente, puede ser provechoso para los conjugados de Hib y sacárido Men no adsorberse en adyuvantes de sal de aluminio o ningún adyuvante en absoluto.

En una realización, la composición inmunogénica no tiene adyuvante. Con el fin de la invención, "sin adyuvante" significa que un componente adyuvante que no es un componente antigénico en sí mismo no está presente en la composición inmunogénica.

40 En una realización de la invención HepB se adsorbe en fosfato de aluminio (documento WO 93/24148).

En una realización, la composición inmunogénica comprende un sacárido Hib conjugado con toxoide tetánico a través de un engarce y sacárido MenC conjugado con toxoide tetánico directamente o a través de un engarce y sacárido MenA conjugado con toxoide tetánico directamente o a través de un engarce.

45 En una realización, la composición inmunogénica de la invención está tamponada a, o ajustada a, pH entre 7,0 y 8,0, pH 7,2 y 7,6 o aproximadamente o exactamente pH 7,4.

La composición inmunogénica o vacunas de la invención opcionalmente se liofilizan en presencia de un agente estabilizante por ejemplo un poliol tal como sacarosa o trehalosa.

50 Al igual que con todas las composiciones inmunogénicas o vacunas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos se tienen que determinar empíricamente. Los factores que se tienen que considerar incluyen la inmunogenicidad, si el inmunógeno estará o no en complejo con o unido covalentemente a un adyuvante o proteína transportadora u otro vehículo, las vías de administración y el número de dosis de inmunización que se tienen que administrar. Tales factores se conocen en la técnica de vacunas y está dentro de la especialidad de los inmunólogos el realizar tales determinaciones sin experimentación excesiva.

El agente activo puede estar presente en concentraciones variables en la composición farmacéutica o vacuna de la invención. Típicamente, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para conseguir su uso pretendido, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución o suspendida de forma homogénea dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico es opcionalmente una que proporcionará una dosis terapéuticamente eficaz única. Para sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para bioactividad tras la reconstitución y la concentración máxima está en el punto en el que una suspensión homogénea no se puede mantener. En el caso de unidades de dosis única, la cantidad es la de una aplicación terapéutica única. En general, se espera que cada dosis comprenda 1-100 µg de antígeno de proteína, opcionalmente 5-50 µg o 5-25 µg. Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo a un paciente humano) sensible a infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de la vía sistémica o mucosal. Un paciente humano es opcionalmente un bebé (menor de 12 meses), un niño pequeño (12-24, 12-16 ó 12-14 meses), un niño (2-10, 3-8 ó 3-5 años), un adolescente (12-25, 14-21 ó 15-19 años) o un adulto (cualquier edad por encima de 12, 15, 18 ó 21). Esas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de administración mucosal a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonías u otitis media (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos se puede prevenir más eficazmente, atenuando de ese modo la infección en su etapa más temprana). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, los componentes de la misma también se pueden co-administrar juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo si están presentes sacáridos en una vacuna éstos se podrían administrar por separado en el mismo momento o 1-2 semanas después de la administración de una vacuna de proteína bacteriana para coordinación óptima de las respuestas inmunes con respecto el uno con el otro). Adicionalmente a una vía de administración única, se pueden usar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, se pueden administrar antígenos virales ID (intradérmico), mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar IM (intramuscular) o IN (intranasal). Si los sacáridos están presentes, los mismos se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Adicionalmente, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de sensibilización e IN para dosis de refuerzo.

La preparación de vacuna se describe en general en Diseño de Vacuna ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación con liposomas se describe por Fullerton, Patente de Estados Unidos N° 4.235.877.

Un aspecto adicional de la invención es un kit de vacuna para administración simultánea o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un huésped frente a la enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer recipiente que comprende uno o más de:

toxoide tetánico (TT)

toxoide de difteria (TD), y

componentes de pertussis de célula completa y

opcionalmente que comprende además antígeno de superficie de Hepatitis B

y un segundo recipiente que comprende:

conjugado de sacárido Hib, y

al menos, uno, dos, tres o cuatro conjugado o conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*,

en el que la dosis de sacárido del conjugado de Hib es menor de 5 µg o 4 µg, o 1-4 µg o -13 µg, o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg y opcionalmente la dosis de sacárido del o de cada uno del al menos o exactamente uno, dos, tres o cuatro conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional (por ejemplo, conjugado o conjugados de sacárido de *N. meningitidis*) es menor de 10 µg, 9 µg, 8 µg, 7 µg, 6 µg, 5 µg o 4 µg, o entre 1-10 µg, 1-8 µg, 1-6 µg, 1-5 µg, 1-4 µg, 1-3 µg, o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg.

Los ejemplos del conjugado de Hib y el al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional (por ejemplo sacárido de *N. meningitidis*) son como se ha descrito anteriormente. Cualquiera de las propiedades de los conjugados descritos anteriormente puede estar presente en un kit de vacuna.

Opcionalmente, los kits de vacuna de la invención comprenden un tercer componente. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer recipiente que comprende uno o más de:

toxoide tetánico (TT)

toxoide de difteria (TD), y

componentes de pertussis de célula completa y

opcionalmente comprende un antígeno de superficie de Hepatitis B

y un segundo recipiente que comprende:

- 5 uno o más conjugados de una proteína transportadora y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [donde el sacárido capsular es opcionalmente a partir de un serotipo neumocócico seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F].

y un tercer recipiente que comprende:

conjugado de sacárido Hib, y

- 10 al menos un conjugado o conjugados de sacárido de *N. meningitidis*,

en el que la dosis de sacárido del conjugado de Hib es menor de 5 µg o 4 µg, o 1-4 µg o 1-3 µg, o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg y opcionalmente la dosis de sacárido del o de cada uno del al menos o exactamente uno, dos, tres o cuatro conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional (por ejemplo conjugado o conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*) es menor de 10 µg, 9 µg, 8 µg, 7 µg, 6 µg, 5 µg o 4 µg, o entre 1-10 µg, 1-8 µg, 1-6 µg, 1-5 µg, 1-4 µg, 1-3 µg, o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg.

- 15 Las composiciones inmunogénicas que comprenden conjugados meningocócicos, por ejemplo HibMenC, HibMenAC, HibMenAW, HibMenAY, HibMenCW, HibMenCY, HibMenWY, MenAC, MenAW, MenAY, MenCW, MenCY, MenWY o MenACWY, incluyendo kits de composición similar a los descritos anteriormente, comprenden opcionalmente antígenos de sarampión y/o paperas y/o rubéola y/o varicela. Por ejemplo, la composición inmunogénica meningocócica contiene antígenos de sarampión, paperas y rubéola o sarampión, paperas, rubéola y varicela. En una realización, estos antígenos virales están presentes opcionalmente en el mismo recipiente que el conjugado o conjugados meningocócicos y/o el sacárido Hib. En una realización, estos antígenos virales están liofilizados.

- 25 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para preparar la composición inmunogénica de la invención, que comprende la etapa de mezclar un conjugado de sacárido Hib con al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional (por ejemplo *N. meningitidis*) y un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en pertussis de célula completa y antígeno de superficie de hepatitis B para formar una composición en la que la dosis de sacárido del conjugado de Hib es menor de 5 µg o 4 µg, o entre 1-4 µg o 1-3 µg, o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg y opcionalmente la dosis de sacárido del o de cada uno del al menos o exactamente uno, dos, tres o cuatro conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional (por ejemplo *N. meningitidis*) es menor de 10 µg, 9 µg, 8 µg, 7 µg, 6 µg, 5 µg o 4 µg, o entre 1-10 µg, 1-8 µg, 1-6 µg, 1-5 µg, 1-4 µg, 1-3 µg, o 2-4 µg o 2-3 µg o aproximadamente o exactamente 2,5 µg.

- 35 Un aspecto adicional de la divulgación es un procedimiento de inmunización de un huésped humano frente a enfermedad causada por *Haemophilus influenzae* y opcionalmente infección por *N. meningitidis* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o el kit de la invención.

Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad causada por *Haemophilus influenzae* y/o *N. meningitidis*.

- 40 Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la preparación de un medicamento para tratamiento o prevención de enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* y/o *N. meningitidis*.

Los términos “que comprende”, “comprenden” y “comprende” en el presente documento tienen por objeto de acuerdo con los inventores ser opcionalmente sustituibles por los términos “que consiste en”, “consisten en” y “consiste en”, respectivamente, en cada caso.

- 45 La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos más adelante se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que se conocen bien y son de rutina para los expertos en la materia, excepto cuando se describa de otra manera en detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - preparación de conjugados de polisacárido

- 50 La unión covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) a TT se llevó a cabo mediante una química de acoplamiento desarrollada por Chu y col (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). El polisacárido

PRP Hib se activó añadiendo CNBr e incubando a pH 10,5 durante 6 minutos. El pH se redujo a pH 8,75 y se añadió dihidrazida de ácido adípico (ADH) y la incubación continuó durante 90 minutos adicionales. El PRP activado se acopló a toxoide tetánico purificado a través de condensación de carbodiimida usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Se añadió EDAC al PRP activado para alcanzar una proporción final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP activado. El pH se ajustó a 5,0 y se añadió toxoide tetánico purificado para alcanzar 2 mg de TT/mg de PRP activado. La solución resultante se dejó durante tres días con agitación suave. Después de filtración a través de una membrana de 0,45 µm, el conjugado se purificó en una columna sephacryl S50HR (Pharmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0,2 M.

Los conjugados de MenC-TT se produjeron usando polisacáridos nativos (de más de 150 kDa medido por MALLS) o se microfluidizaron ligeramente. Los conjugados de MenA-TT se produjeron usando polisacárido nativo o polisacárido ligeramente microfluidizado de más de 60 kDa medido por el procedimiento MALLS del ejemplo 2. Los conjugados de MenW y MenY-TT se produjeron usando polisacáridos dimensionados de aproximadamente 100-200 kDa medido por MALLS (véase el ejemplo 2). El ajuste de tamaño se realizó mediante microfluidización usando un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. Los polisacáridos después se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

La activación y el acoplamiento se realizaron como se ha descrito en los documentos WO96/29094 y WO 00/56360. En resumen, el polisacárido a una concentración de 10-20 mg/ml en NaCl 2 M pH 5,5-6,0 se mezcló con solución de CDAP (100 mg/ml recién preparado en acetonitrilo/WFI, 50/50) a una proporción final de CDAP/polisacárido de 0,75/1 ó 1,5/1. Después de 1,5 minutos, el pH se elevó con hidróxido de sodio a pH 10,0. Después de tres minutos se añadió toxoide tetánico para alcanzar una proporción de proteína/polisacárido de 1,5/1 para MenW, 1,2/1 para MenY, 1,5/1 para MenA o 1,5/1 para MenC. La reacción continuó durante una a dos horas.

Después de la etapa de acoplamiento, se añadió glicina a una proporción final de glicina/PS (p/p) de 7,5/1 y el pH se ajustó a pH 9,0. La mezcla se dejó durante 30 minutos. El conjugado se aclaró usando un filtro Kleenpak de 10 µm y después se cargó en una columna Sephacryl S400HR usando un tampón de elución de NaCl 150 mM, Tris 10 mM o 5 mM pH 7,5. Los lotes clínicos se filtraron en una membrana de esterilización Opticap 4. Los conjugados resultantes tenían una proporción de polisacárido:proteína promedio de 1:1-1:5 (p/p).

Con el fin de conjugar polisacárido capsular MenA a toxoide tetánico a través de un espaciador, se usó el siguiente procedimiento. La unión covalente del polisacárido y del espaciador (ADH) se lleva a cabo mediante una química de acoplamiento mediante la cual el polisacárido se activa en condiciones controladas mediante un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de sus grupos hidrazino, para formar un enlace de isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

Una solución de 10 mg/ml de MenA se trató con una solución recién preparada de 100 mg/ml de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una proporción de CDAP/MenA de 0,75 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se elevó a pH 10,0. Tres minutos más tarde, se añadió ADH para obtener una proporción de ADH/MenA de 8,9. El pH de la solución se redujo a 8,75 y la reacción progresó durante 2 horas.

Antes de la reacción de conjugación, la solución de TT purificada y la solución de PSA_{AH} se diluyeron para alcanzar una concentración 10 mg/ml para PSA_{AH} y 10 mg/ml para TT.

Se añadió EDAC a la solución de PSA_{AH} con el fin de alcanzar una proporción final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSA_{AH}. El pH se ajustó a 5,0. El toxoide tetánico purificado se añadió con una bomba peristáltica (en 60 minutos) para alcanzar 2 mg de TT/mg de PSA_{AH}. La solución resultante se dejó 60 min a +25° C en agitación para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. El conjugado se aclaró usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna Sephacryl S400HR.

Ejemplo 2 – determinación de peso molecular usando MALLS

Se acoplaron detectores a una columna de exclusión por tamaño de HPLC a partir de la cual se eluyeron las muestras. Por una parte, el detector de dispersión de luz láser midió las intensidades de luz dispersas en 16 ángulos por la solución macromolecular y por otra parte, un refractómetro interferométrico colocado en línea permitió la determinación de la cantidad de muestra eluida. A partir de estas intensidades, se puede determinar el tamaño y la forma de las macromoléculas en solución.

El peso molecular promedio en peso (P_m) se define como la suma de los pesos de todas las especies multiplicadas por sus pesos moleculares respectivos y divididos entre la suma de los pesos de todas las especies.

a) Peso molecular promedio en peso: - P_m -

$$P_m = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

b) Peso molecular promedio en número: -Mn-

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

c) Radio cuadrático medio: -Rw- y R²w es el radio cuadrado definido por:

$$R^2_w \text{ o } (r^2)_w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

5 (-m_i- es la masa del centro de dispersión i y -r_i- es la distancia entre el centro de dispersión i y el centro de gravedad de la macromolécula).

d) La polidispersidad se define como la proporción -Pm / Mn-.

10 Los polisacáridos meningocócicos se analizaron mediante MALLS mediante la carga en dos columnas de HPLC (TSKG6000 y 5000PWxl TOSOH Bioscience) usadas en combinación. 25 µl del polisacárido se cargaron en la columna y se eluyeron con 0,75 ml de agua filtrada. Los polisacáridos se detectan usando un detector de dispersión de luz (Wyatt Dawn DSP provisto de un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (Wyatt Otilab DSP provisto de una celda P100 y un filtro rojo a 498 nm).

Las polidispersidades y recuperaciones de peso molecular de todas las muestras se calcularon mediante el método de Debye usando un orden de ajuste polinomial de 1 en el software Astra 4.72.

15 Ejemplo 3 Ensayo clínico de Fase II en vacuna de conjugado HibMenAC – TT mezclada con DTPwHepB

Diseño de estudio: estudio de centro único abierto, aleatorizado (1:1:1:1) con cinco grupos. Los cinco grupos recibieron el siguiente régimen de vacunación respectivamente a 6, 10 y 14 semanas de edad.

- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/2,5/2,5: denominado en lo sucesivo en el presente documento 2,5/2,5/2,5
- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/5/5: denominado en lo sucesivo en el presente documento 2,5/5/5
- 20 • Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5: denominado en lo sucesivo en el presente documento 5/5/5
- Tritanrix™-HepB + Hiberix™: denominado en lo sucesivo en el presente documento Hiberix
- Tritanrix™-HepB/Hiberix™ + Meningitec™: denominado en lo sucesivo en el presente documento Meningitec

Las muestras de sangre se tomaron en el momento de la primera dosis de vacuna (Pre) y un mes después de la tercera dosis de vacuna (Post-dosis 3).

25 Tritanrix™ es una vacuna de DTPw comercializada por GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

Se usaron 105 sujetos en cada uno de los cinco grupos dando un total de 525 sujetos en el estudio.

Tabla 1

Componentes por dosis (0,5 ml)	2,5/2,5/2,5*	2,5/5/5	5/5/5
Polisacárido capsular PRP Hib conjugado con toxoide tetánico (TT)	2,5 µg	2,5 µg	5 µg
Polisacárido capsular A de <i>Neisseria meningitidis</i> (PSA) conjugado con TT	2,5 µg	5 µg	5 µg
Polisacárido capsular C de <i>Neisseria meningitidis</i> (PSC) conjugado con TT	2,5 µg	5 µg	5 µg
*La vacuna 2,5/2,5/2,5 fue una dilución de dosis de la vacuna Hib-MenAC 5/5/5 de GSK Biologicals que contiene 2,5 µg de cada uno de PRP-TT, MenA-TT y MenC-TT.			

30 Las formulaciones de vacuna de Hib-MenAC se mezclaron de forma improvisada con Tritanrix-HepB. La vacuna combinada de difteria-tétano-*Bordetella pertussis* de célula entera – hepatitis B (DTPw-HB) de GSK Biologicals (Tritanrix-HepB) contiene no menos de 30 Unidades Internacionales (UI) de toxoide de difteria, no menos de 60 UI de toxoide tetánico, no menos de 4 UI de *Bordetella pertussis* muerta y 10 µg de antígeno de superficie de hepatitis B recombinante.

Terapia de referencia, dosis, modo de administración, N° de lote:

5 *Programa/sitio de vacunación:* Un grupo recibió vacuna Tritanrix-HepB por vía intramuscular en el muslo izquierdo e Hiberix™ por vía intramuscular en el muslo derecho a 6, 10 y 14 semanas de edad. Otro grupo recibió vacuna Tritanrix™-HepB/Hiberix™ por vía intramuscular en el muslo izquierdo y vacuna Meningitec™ por vía intramuscular en el muslo derecho a 6, 10 y 14 semanas de edad.

Vacuna/composición/dosis/número de lote: La vacuna Tritanrix™-HepB usada fue como se ha descrito anteriormente.

10 Una dosis (0,5 ml) de vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae* de tipo b de GSK Biologicals: Hiberix™ contenía 10 µg de PRP conjugado con toxoide tetánico. En el Grupo Hiberix, se mezcló con diluyente estéril y en el Grupo Meningitec se mezcló con Tritanrix-HepB.

Una dosis (0,5 ml) de vacuna MENINGITEC™ de Wyeth Lederle contenía: 10 µg de polisacárido capsular de grupo C meningocócico conjugado con 15 µg de proteína CRM197 de *Corynebacterium diphtheria* y aluminio en forma de sales.

Resultados – respuestas inmunes generadas frente a Hib, MenA y MenC

Tabla 2b SBA – MenC

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS
% ≥ 1:8	99	94,7	100	100	96,5	100	100	96,5	100	2,9	0,6	8,4	100	96,5	100
TMG	3132	2497	3930	4206	3409	5189	3697	3118	4384	4,7	3,9	5,6	4501	3904	5180

Tabla 2c SBA MenA

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS
% ≥ 1:8	99,7	91,9	99,7	100	95,8	100	100	96,2	100	6,8	2,5	14,3	9,1	4,0	17,1
TMG	316,7	251,4	398,9	418,5	358,6	488,5	363	310,5	424,4	5,6	4,3	7,4	5,6	4,4	7,2

Tabla 2e Anti – PSA (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS
% ≥ 0,3	100	96,4	100	100	96,5	100	99,0	94,8	100	1,0	0,0	5,4	5,9	2,2	12,5
CMG	18,10	15,34	21,35	26,51	22,93	30,79	23,40	20,05	27,30	0,15	0,15	0,15	0,17	0,15	0,18

Tabla 2f Anti-BPT (EL.U/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS
% VR	100	96,4	100	98	93,1	99,8	94,2	87,8	97,8	100	96,3	100	99,0	94,7	100
CMG	108,2	94,4	123,9	81,4	70,5	94,0	60,1	51,0	70,8	110,2	96,1	126,3	86,7	75,4	99,7

Tabla 2g Anti – HBs (mUI/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS	%	95%CL	LS
% ≥ 10	92,1	85,0	96,5	83,8	75,1	90,5	82,5	73,8	89,3	91,6	84,1	96,3	83,2	74,4	89,9
CMG	128,6	95,4	173,4	71,8	53,2	96,9	55,3,1	41,0	74,6	104,5	76,0	143,7	71,1	52,1	97,1

Conclusión

Las tablas 2f y 2g demuestran que, cuando se mezcla HibMenAC con DTPwHepB en una vacuna, una dosis de 2,5/2,5/2,5 de Hib/MenA/MenC proporciona una respuesta inmune más elevada frente a toxoide de pertussis y antígeno de superficie de Hepatitis que una dosis de 2,5/5/5 la cual, a su vez, genera una respuesta inmune más elevada frente a toxoide de pertussis y antígeno de superficie de Hepatitis B que una dosis de 5/5/5. Las Tablas 2a-e demuestran que una dosis baja de HibMenA y MenC aún consigue una respuesta inmune frente a Hib, MenA y MenC con el 99-100% de los pacientes consiguiendo una respuesta inmune por encima de los umbrales elegidos.

Ejemplo 4 Ensayo Clínico de HibMenAC – sensibilización con conjugados de HibMenAC

Se llevó a cabo un estudio de fase II, abierto, aleatorizado para evaluar la memoria inmune inducida por curso de vacunación primaria de vacuna Tritanrix™-HepB/HibMenAC y para evaluar la inmunogenicidad y reactogenicidad de una dosis de refuerzo de la vacuna Tritanrix™-HepB de GSK Biologicals mezclada con vacuna conjugada de Hib-MenAC de GSK Biologicals o vacuna Hib_{2,5} de GSK Biologicals a los 15 a 18 meses de edad en sujetos sensibilizados con Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC. Cinco grupos recibieron los regímenes de vacunación primaria a las 6, 10 y 14 semanas de edad como se presenta en la tabla 3.

Tabla 3

Vacunación primaria	Grp	A 10 meses de edad	A 15 a 18 meses de edad
Grupos de tratamiento			
Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/2,5/2,5	1	1/5ª dosis de Mencevax™ AC (10 µg de MenA y 10 µg de MenC) y 10 µg	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
	2	-	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5	3	1/5ª dosis de Mencevax™ AC (10 µg de MenA y 10 µg de MenC) y 10 µg de PRP Simple	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
	4	-	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
Tritanrix™-HepB/Hib-MenA 2,5/5/5	5	1/5ª dosis de Mencevax™ AC (10 µg de MenA y 10 µg de MenC) y 10 µg de PRP Simple	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
	6	-	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
Grupos de control			
Tritanrix™-HepB + Hiberix™	7	1/5ª dosis de Mencevax™ AC (10 µg de MenA y 10 µg de MenC) y 10 µg de PRP Simple	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC
	8	-	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC
Tritanrix™-HepB I Hiberix™ + Meningitec™	9	1/5ª dosis de Mencevax™ AC (10 µg de MenA y 10 µg de MenC) y 10 µg de PRP Simple	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC
	10	-	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC

Se tomaron muestras de sangre de los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 en el momento del refuerzo con polisacárido simple (PS) (es decir, Pre-PS – Mes 10) y un mes después del refuerzo con polisacárido simple (es decir Post-PS-Mes 11).

Nota: Se han presentado los resultados de inmunogenicidad obtenidos en los cinco grupos que recibieron el refuerzo de polisacárido (es decir, los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9).

Número de sujetos: Planificados: 450 (45 sujetos por grupo)

Inscritos: En los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 que recibieron el refuerzo de polisacárido simple se inscribió un total de 193 sujetos (42 en el Grupo 1, 39 en el Grupo 3, 37 en el Grupo 5, 36 en el Grupo 7 y 39 en el Grupo 9). **Completado:** No aplicable.

Inmunogenicidad: Cohorte de inscritos total = 193 sujetos.

Nota: En este estudio la cohorte de inscritos total = cohorte de vacunados total.

5 Diagnóstico y criterios de inclusión: Un sujeto hembra o macho de 10 meses de edad que había completado el curso de vacunación primaria de tres dosis descrito en el ejemplo 1, sin problemas de salud obvios, que no había recibido una vacunación de refuerzo previa frente a enfermedad de difteria, tétanos, pertussis, hepatitis B, serogrupos A o C meningocócicos y/o Hib desde la visita de conclusión del estudio del estudio primario. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito del padre/tutor del sujeto antes de la entrada al estudio.

Vacunas de estudio, dosis, modo de administración, nº de lote: Todas las vacunas usadas en este estudio se desarrollaron y fabricaron por GSK Biologicals.

10 *Programa/sitio de vacunación:* Los sujetos en los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 recibieron la vacuna combinada de polisacárido A y polisacárido C, 1/5ª dosis de Mencevax™ AC y 10 µg de PRP simple como una inyección intramuscular en el muslo antero lateral izquierdo y derecho a los 10 meses de edad, respectivamente.

15 **Duración del tratamiento:** La duración del estudio completo fue aproximadamente 6 a 9 meses por sujeto que incluían la vacunación de refuerzo administrada a los 15 a 18 meses de edad. Se realizó un análisis provisional en el Mes 11 (es decir, un mes después de la administración del refuerzo de polisacárido simple en el Mes 10).

Criterios de evaluación: Antes de y un mes después de la administración del refuerzo de polisacárido simple los criterios de evaluación de los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 fueron los siguientes:

- Título de anticuerpo SBA-MenA \geq 1:8

- Título de anticuerpo SBA-MenC \geq 1:8

20 - Concentración de anticuerpo Anti-PSA \geq 0,3 µg/ml

- Concentración de anticuerpo Anti-PSC \geq 0,3 µg/ml

- Concentración de anticuerpo Anti-PRP \geq 0,15 µg/ml.

25 *Métodos estadísticos:* Este análisis provisional se basó en la cohorte de inscritos total. Todos los análisis fueron puramente descriptivos y no se calculó ninguna inferencia estadística en ningún punto final. Los análisis se realizaron únicamente para los cinco grupos (es decir, Grupos 1, 3, 5, 7 y 9) que recibieron el refuerzo de polisacárido simple a los 10 meses de edad. Aunque estos cinco grupos eran sub-grupos de los grupos principales en el estudio primario, los resultados se presentan como por la asignación del grupo de estudio primario.

30 *Análisis de inmunogenicidad:* Los resultados obtenidos en los tres puntos de tiempo se han presentado en este ejemplo concretamente, un mes después de la tercera dosis de vacuna en el estudio de vacunación primaria (Ejemplo 1), antes de la administración del refuerzo de polisacárido (es decir, a los 10 meses de edad) para evaluación de la persistencia de respuesta inmune después de la vacunación primaria y un mes después de la administración del refuerzo de polisacárido (es decir, a los 11 meses de edad) para evaluación de la memoria inmune inducida por la vacunación primaria. En cada punto de tiempo: Las Concentraciones o Títulos de anticuerpo Medios Geométricos (CMG o TMG) con intervalos de confianza (IC) del 95% se tabularon para ensayo bactericida en suero (SBA)-MenC, SBA-MenA, anti-PSC, anti-PSA y anti-PRP. La seropositividad o los índices de seroprotección con IC del 95% exacto se calcularon para cada anticuerpo. Las concentraciones o títulos de anticuerpo antes del refuerzo con polisacárido y un mes después del refuerzo con polisacárido se investigaron usando curvas acumulativas inversas (CAI) para cada antígeno y serotipo.

Resultados

40 *Resultados Demográficos:* La edad media de la cohorte inscrita total fue 43,2 semanas con una desviación típica de 6,5 semanas. La proporción de macho a hembra fue 1,3 (110/83). Todos los sujetos pertenecían a la raza Asiática Oriental o Asiática Sudoriental.

Resultados de Inmunogenicidad: Los resultados de inmunogenicidad para la cohorte inscrita total se presentan en la tabla 4.

45

ES 2 377 075 T3

Tabla 4a

Anticuerpo	Grupo	Momento		IC 95% (LI, LS)		CMG/TMG	IC 95% (LI, LS)	
Anti-PRP (% ≥ 0,15 µg/ml)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,0	91,6	100,00	17,872	11,358	28,123
		PRE-PS	97,5	86,8	99,9	6,940	4,402	10,941
		POST-PS	100,0	91,6	100,0	66,510	38,690	114,334
	5/5/5	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	17,306	11,477	26,095
		PRE-PS	94,9	82,7	99,4	4,520	2,946	6,937
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	44,418	26,595	74,186
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,5	100,0	22,848	15,217	33,223
		PRE-PS	100,0	89,7	100,0	5,092	3,290	7,883
		POST-PS	100,0	90,5	100,0	54,244	32,251	91,234
	Hiberix™	PIII(M3)	100,0	90,3	100,0	30,106	18,316	49,485
		PRE-PS	100,0	90,3	100,0	5,105	3,238	8,049
		POST-PS	100,0	90,3	100,0	37,049	21,335	64,336
	Meningitec™	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	12,257	8,234	18,246
		PRE-PS	100,0	91,0	100,0	4,227	2,804	6,372
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	24,354	15,308	38,747
SBA-MenA (%≥1:8)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	97,1	84,7	99,9	342,3	230,7	507,9
		PRE-PS	91,1	77,5	98,2	161,9	93,9	279,1
		POST-PS	100,00	88,4	100,0	737,2	577,3	941,4
	5/5/5	PIII(M3)	100,00	90,0	100,0	394,6	297,8	523,0
		PRE-PS	94,3	80,8	99,3	193,2	126,7	294,7
		POST-PS	96,7	82,8	99,9	720,8	479,8	1082,7
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,0	100,0	385,8	285,9	520,5
		PRE-PS	88,2	72,5	96,7	162,7	95,8	276,2
		POST-PS	100,0	88,4	100,0	929,9	718,4	1203,6
	Hiberix™	PIII(M3)	10,0	2,1	26,5	6,6	3,7	11,7
		PRE-PS	72,7	54,5	86,7	96,9	46,0	204,1
		POST-PS	100,0	89,4	100,0	631,8	475,5	839,4
	Meningitec™	PIII(M3)	6,9	0,8	22,8	4,8	3,6	6,4
		PRE-PS	80,0	63,1	91,6	119,7	62,7	228,3
		POST-PS	92,1	78,6	98,3	449,9	271,7	745,0
SBA-MenC (%≥1:8)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,0	91,6	100,0	3342,3	2466,9	4528,3
		PRE-PS	90,5	77,4	97,3	322,3	190,2	546,1
		POST-PS	100,0	91,6	100,0	2713,5	1909,4	3856,2

ES 2 377 075 T3

(continuación)

Anticuerpo	Grupo	Momento		IC 95% (LI, LS)		CMG/TMG	IC 95% (LI, LS)	
	5/5/5	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	3863,1	3025,9	4932,1
		PRE-PS	97,3	85,8	99,9	463,9	292,9	734,7
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	2377,3	1665,4	3393,4
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,5	100,0	5339,0	3829,4	7443,6
		PRE-PS	94,6	81,8	99,3	451,4	281,7	723,5
		POST-PS	100,0	90,3	100,0	2824,7	2048,1	3895,8
	Hiberix™	PIII(M3)	2,8	0,1	14,5	4,5	3,6	5,7
		PRE-PS	5,7	0,7	19,2	4,8	3,6	6,4
		POST-PS	17,6	6,8	34,5	9,8	4,8	19,7
	Meningitec™	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	4557,8	3539,3	5869,5
		PRE-PS	97,4	86,5	99,9	347,7	221,6	545,4
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	1557,7	1090,8	2224,4
IC 95%: intervalo de confianza del 95%; LI: Límite Inferior; LS: Límite Superior; CMG/TMG: Concentración Media Geométrica/Título Medio Geométrico PIII(M3): Muestra de sangre post-vacunación obtenida un mes después de la tercera dosis de la vacunación primaria de tres dosis PRE-PS: Muestra de sangre obtenida antes del refuerzo de polisacárido simple en el Mes 10 POST-PS: Muestra de sangre obtenida un mes después del refuerzo de polisacárido simple								

Tabla 4b

Anticuerpo	Grupo	Momento		IC 95% (LI, LS)		CMG/TMG	IC 95% (LI, LS)	
Anti-PSA (% ≥ 0,3 µg/ml)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,0	91,6	100,00	17,64	13,52	23,02
		PRE-PS	92,5	79,6	98,4	1,79	1,22	2,62
		POST-PS	100,0	91,6	100,0	23,58	16,76	33,17
	5/5/5	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	26,06	20,30	33,45
		PRE-PS	97,4	86,5	99,9	2,25	1,60	3,18
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	24,13	17,64	33,01
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,3	100,0	24,03	18,84	30,65
		PRE-PS	91,2	76,3	98,1	1,47	0,99	2,19
		POST-PS	100,0	90,5	100,0	22,68	15,81	32,54
	Hiberix™	PIII(M3)	0,0	0,0	10,3	0,15	0,15	0,15
		PRE-PS	5,6	0,7	18,7	0,16	0,15	0,17
		POST-PS	75,8	57,7	88,9	1,03	0,55	1,93

ES 2 377 075 T3

(continuación)

Anticuerpo	Grupo	Momento		IC 95% (LI, LS)		CMG/TMG	IC 95% (LI, LS)	
	Meningitec™	PIII(M3)	2,6	0,1	13,8	0,16	0,14	0,17
		PRE-PS	7,7	1,6	20,9	0,16	0,15	0,18
		POST-PS	66,7	49,8	80,9	0,84	0,49	1,42
Anti-PSC (% ≥ 0,3 µg/ml)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,00	91,6	100,00	48,45	39,65	59,20
		PRE-PS	100,00	91,2	100,00	7,11	5,69	8,89
		POST-PS	100,00	91,2	100,00	21,55	17,24	26,94
	5/5/5	PIII(M3)	100,00	91,0	100,00	56,42	48,16	66,11
		PRE-PS	100,00	91,0	100,00	8,32	6,74	10,28
		POST-PS	100,00	90,0	100,00	22,32	18,21	27,36
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,00	90,3	100,00	76,98	62,69	94,53
		PRE-PS	100,00	89,7	100,00	8,64	6,93	10,77
		POST-PS	100,00	90,5	100,00	24,75	19,37	31,61
	Hiberix™	PIII(M3)	6,1	0,7	20,2	0,16	0,15	0,18
		PRE-PS	0,0	0,0	9,7	0,15	0,15	0,15
		POST-PS	100,00	90,3	100,0	8,05	5,73	11,3
Meningitec™	PIII(M3)	100,00	91,0	100,00	59,05	48,16	72,41	
	PRE-PS	100,00	91,0	100,00	7,33	5,51	9,75	
	POST-PS	100,00	90,7	100,00	17,13	13,38	21,94	
IC 95%: intervalo de confianza del 95%; LI: Límite Inferior; LS: Límite Superior; CMG/TMG: Concentración Media Geométrica/Título Medio Geométrico PIII(M3): Muestra de sangre post-vacunación obtenida un mes después de la tercera dosis de la vacunación primaria de tres dosis PRE-PS: Muestra de sangre obtenida antes del refuerzo de polisacárido simple en el Mes 10 POST-PS: Muestra de sangre obtenida un mes después del refuerzo de polisacárido simple								

Conclusión

5 La formulación de vacuna conjugada de HibMenAC 2,5/5/5 que contiene una cantidad más baja de Hib tuvo tendencia a proporcionar una respuesta de memoria inmune mejor a MenA y MenC en ensayos SBA que las formulaciones de vacunas que contienen cantidades iguales de los tres conjugados. Esto se puede observar a partir de una comparación de las lecturas POST-PS. Por lo tanto, el uso de la formulación 2,5/5/5 en sensibilización da como resultado una mejor respuesta de memoria inmune.

10 Observando los datos de PIII(M3), se observaron lecturas superiores para la formulación 2,5/5/5 para Hib (22,5 v 17) y MenC (76 v 48 ó 56 y 5339 v 3342 ó 3863 mediante SBA) .

Ejemplo 5a: Ensayo clínico usando HibMenCY proporcionado simultáneamente con Infanrix penta y Prevenar en bebés a 2, 4 y 6 meses

15 **Diseño de estudio:** Estudio multicéntrico controlado de Fase II, abierto (parcialmente doble-ciego*), aleatorizado (1:1:1:1) con cinco grupos paralelos que recibieron vacunas simultáneas de la forma siguiente como un curso de vacunación primaria de 3 dosis a las edades de 2, 4 y 6 meses:

Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5 : Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix® penta + Prevenar®

Grupo Hib-MenCY 5/10/10 : Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix® penta + Prevenar®

Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix® penta + Prevenar®

Grupo Menjugate : Menjugate® + Act HIB® + Infanrix® penta**

Grupo ActHIB : ActHIB® + Infanrix® penta + Prevenar®

5 * Hib-MenCY (2,5/5/5) y Hib-MenCY (5/10/10) se administraron de una manera doble-ciego. La formulación de Hib-MenCY (5/5/5) no se pudo administrar en un doble ciego ya que la misma se preparó reconstituyendo una formulación de Hib-MenCY (10/10/10) con 1,0 ml de diluyente (la mitad de la solución se descartó y se administraron los 0,5 ml restantes), mientras que las formulaciones de Hib-MenCY (2,5/5/5) y Heib-MenCY (5/10/10) se administraron después de reconstitución con 0,5 ml de diluyente.

10 ** A los sujetos de este grupo se ofrecieron dos dosis con licencia de vacuna conjugada neumocócica al final del estudio de refuerzo 792014/002 de acuerdo con la información de prescripción.

Las muestras de sangre (4,0 ml) se obtuvieron a partir de todos los sujetos antes de y un mes después de la finalización del curso de vacunación primaria (Mes de Estudio 0 y Mes de Estudio 5).

15 El estudio se planificó para realizarse en 400 sujetos con 80 sujetos en cada uno de los cinco grupos. El estudio se completó con un total de 398 sujetos (Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: 80 Grupo Hib-MenCY 5/10/10: 81; Grupo Hib-MenCY 5/5/5: 78; Grupo Menjugate: 81; Grupo ActHIB: 78)

Programa/sitio de vacunación: Se inyectaron tres dosis por vía intramuscular en intervalos de dos meses, a aproximadamente 2, 4 y 6 meses de edad de la manera siguiente:

Table 5: Vacunas administradas y sitio

Grupo	Vacunas administradas muslo izquierdo	Vacunas administradas muslo derecho
Hib-MenCY 2,5/5/5	Hib-TT (2,5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	. DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior . Neumocócica (Prevenar®): inferior
Hib-MenCY 5/10/10	Hib-TT (2,5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	. DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior . Neumocócica (Prevenar®): inferior
Hib-MenCY 5/5/5	Hib-TT (2,5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	. DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior . Neumocócica (Prevenar®): inferior
Menjugate®	AcTHIB®	. DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior . Neumocócica (Prevenar®): inferior
ActHIB®	AcTHIB®	. DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior . Neumocócica (Prevenar®): inferior

Tabla 6: Formulación de vacuna candidata y números de lote

Vacuna	Formulación: contenido/dosis	Presentación	Nº de lote (nº de lote de diluyente)
Hib-MenCY 2,5/5/5	2,5 µg de polirribosil ribitol (PRP) polisacárido capsular de tipo b de <i>H. influenzae</i> conjugado con toxoide tetánico (TT); 5 µg de polisacárido capsular de serogrupo C de <i>N. meningitidis</i> (PSC) conjugado con TT; 5 µg de de polisacárido capsular de serogrupo Y de <i>N. meningitidis</i> (PSY) conjugado con TT	Sedimento liofilizado en vial monodosis (0,5 ml después de reconstitución con diluyente de solución salina)	DCYH003A48 (01B20/22A)
Hib-MenCY 5/10/10	5 µg de PRP conjugado con TT; 10 µg de PSC conjugado con TT; 10 µg de PSY conjugado con TT	Sedimento liofilizado en vial monodosis (0,5 ml después de reconstitución con diluyente de solución salina)	DCYHO02A48 (01 B20/22A)
Hib-MenCY 5/5/5	5 µg de PRP conjugado con TT; 5 µg de PSC conjugado con TT; 5 µg de PSY conjugado con TT	Sedimento liofilizado en vial monodosis*	DCYHO02A48 (01 B20/22A)
* El Hib-MenCY 5/5/5 se preparó disolviendo formulación de Hib-MenCY 10/10/10 con 1,0 ml de diluyente; se administraron 0,5 ml y los 0,5 ml restantes se descartaron.			

Criterios de evaluación:

- 5 Inmunogenicidad: Medición de títulos/concentraciones de anticuerpo frente a cada antígeno de vacuna antes de la primera dosis (Mes 0) y aproximadamente un mes después de la tercera dosis (Mes 5) en todos los sujetos. La determinación de títulos de anticuerpo bactericidas frente a serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (SBA-MenC y SBA-MenY) mediante un ensayo bactericida (puntos de corte de ensayo: una dilución de 1:8 y 1:128) y medición de ELISA de anticuerpos frente a serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (anti-PSC y anti-PSY, puntos de corte de ensayo $\geq 0,3 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$), el PRP de polisacárido Hib (anti-PRP, puntos de corte de ensayo $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$), los tres antígenos de pertussis (anti-PT, anti-FHA, anti-PRN, punto de corte de ensayo $\geq 5 \text{ EL.U/ml}$), anticuerpos frente a antígeno de superficie de hepatitis B (anti-HBs, punto de corte de ensayo $\geq 10 \text{ mUI/ml}$), toxoides de difteria y tetánico (anti-difteria y anti-tétano, punto de corte de ensayo 0,1 UI/ml); anti-poliovirus de tipos 1, 2 y 3 (punto de corte de ensayo 1:8); siete serotipos neumocócicos anti-4, anti-6B, anti-9V, anti-14, anti-18C, anti-19F, anti-23F (punto de corte de ensayo 0,05 µg/ml).
- 10
- 15 La respuesta de vacuna primaria a los antígenos de pertussis se definió como seropositividad (anticuerpos detectables) después de la tercera dosis en sujetos con anticuerpos previamente indetectables o al menos mantenimiento de concentración prevacunación de anticuerpo en sujetos que inicialmente eran seropositivos.
- 20 *Seguridad* (Criterios de evaluación): seguimiento de 8-días (Días 0 a 7), después de la administración de cada dosis de vacuna, de síntomas locales (dolor, enrojecimiento, inflamación) y generales (mareos, fiebre, irritabilidad y pérdida del apetito) solicitados registrados en tarjetas diarias por los padres/tutores de los sujetos; seguimiento de 31 días (Días 0 a 30), después de cada dosis de vacuna, de acontecimientos adversos no graves no solicitados y de acontecimientos adversos graves (AAG) durante todo el periodo de estudio.

Métodos estadísticos:

Inmunogenicidad

5 Las Concentraciones o Títulos Medios Geométricos de anticuerpo (CMG/T) con los intervalos de confianza (IC) del 95% se tabularon para cada antígeno. El cálculo de CMG/T se realizó tomando el anti-logaritmo en base 10 (anti-log10) de la media de las transformaciones log10 de concentración o de título. A las concentraciones o títulos de anticuerpo por debajo del punto de corte de ensayo se asignó un valor arbitrario de la mitad del punto de corte con el fin del cálculo de CMG/T. Se calcularon los porcentajes de sujetos con concentración/título de anticuerpo por encima de los puntos de corte de ensayo especificados o con una respuesta de vacuna con IC del 95% exacto. Las concentraciones/títulos de anticuerpo se investigaron usando curvas acumulativas inversas de anticuerpo para cada antígeno post-vacunación. La distribución de concentración de anticuerpo de los 7 antígenos neumocócicos se tabuló. Las diferencias entre los grupos Hib-MenCY, en comparación con el grupo de control se evaluaron de una manera exploratoria para cada anticuerpo, excepto para SBA-MenY y anti-PSY, en términos de (1) la diferencia entre el grupo de control (menos) los grupos Hib-MenCY para el porcentaje de sujetos por encima de los puntos de corte especificados o con una respuesta de vacuna con su IC del 95% asintótico estandarizado, (2) las proporciones de CMG o CMT del grupo de control con relación a los grupos Hib-MenCY con su IC del 95%. El grupo de control fue Menjugate para SBA-MenC y anti-PSC; el grupo de control para todos los otros antígenos fue el Grupo ActHIB. Se realizaron las mismas comparaciones para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones de Hib-MenCY para anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY y anticuerpos anti-tétano.

Índices de seroprotección/seropositividad y CMG/T (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

20 Tabla 7a Anti – PRP (µg/ml)

Grupo	N	%≥0,15	LI	LS	≥1	LI	LS	CMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	74	100,0	95,1	100,0	97,3	90,6	99,7	6,441	5,315	7,805
Hib MenCY 5/10/10	76	100,0	95,3	100,0	98,7	92,9	100,0	7,324	5,877	9,127
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	92,9	84,1	97,6	5,577	4,375	7,110
Menjugate™	74	98,6	92,7	100,0	89,2	79,8	95,2	4,465	3,399	5,865
ActHIB™	74	100,0	95,1	100,0	94,6	86,7	98,5	5,714	4,538	7,195

Tabla 7b SBA - MenC (1/Dil)

Grupo	N	%≥1:8	LI	LS	≥1:128	LI	LI	TMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	98,6	92,2	100,0	1293,1	1027,7	1627,1
Hib MenCY 5/10/10	76	100,0	95,3	100,0	97,4	90,8	99,7	1065,6	858,8	1322,3
Hib MenCY 5/5/5	72	100,0	95,3	100,0	95,8	88,3	99,1	968,4	770,8	1216,6
Menjugate™	74	100,0	95,1	100,0	98,6	92,7	100,0	1931,9	1541,2	2421,6
ActHIB™	76	1,3	0,0	7,1	0,0	0,0	4,7	4,2	3,8	4,5

Tabla 7c Anti - PSC (µg/ml)

Grupo	N	%≥0,3	LI	LS	≥2	LI	LS	CMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	63	100,0	94,3	100,0	98,4	91,5	100,0	12,02	9,90	14,59
Hib MenCY 5/10/10	65	100,0	94,5	100,0	100,0	94,5	100,0	12,09	10,59	13,81
Hib MenCY 5/5/5	61	100,0	94,1	100,0	98,4	91,2	100,0	9,95	8,34	11,87
Menjugate™	62	100,0	94,2	100,0	100,0	94,2	100,0	15,36	12,67	18,62
ActHIB™	63	1,6	0,0	8,5	0,0	0,0	5,7	0,15	0,15	0,16

Tabla 7d SBA-MenY (1/Dil)

Grupo	N	%≥1:8	LI	LS	≥1:128	LI	LS	TMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	67	98,50	92,0	100,0	95,5	87,5	99,1	843,5	640,1	1111,7
Hib MenCY 5/10/10	68	100,0	94,7	100,0	97,1	89,8	99,6	1020,0	790,0	1316,8
Hib MenCY 5/5/5	69	98,6	92,2	100,0	89,9	80,2	95,8	741,8	838,0	1022,9
Menjugate™	68	14,7	7,3	25,4	8,8	3,3	18,2	6,9	5,0	9,5
ActHIB™	74	16,2	8,7	26,6	9,5	3,9	18,5	7,3	5,2	10,1

5

Tabla 7e Anti - PSY (µg/ml)

Grupo	N	%≥0,3	LI	LS	≥2	LI	LS	CMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	67	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	19,22	15,42	23,95
Hib MenCY 5/10/10	70	100,0	94,9	100,0	98,6	92,3	100,0	19,09	15,44	23,59
Hib MenCY 5/5/5	72	100,0	95,0	100,0	97,2	90,3	99,7	15,83	12,64	19,82
Menjugate™	66	3,0	0,4	10,5	0,0	0,0	5,4	0,16	0,15	0,17
ActHIB™	69	0,0	0,0	5,2	0,0	0,0	5,2	0,15	0,15	0,15

Conclusión

Las formulaciones 2,5/5/5 y 5/10/10 dieron como resultado títulos más elevados frente a Hib, MenC y MenY en términos de inmunogenicidad y resultados de SBA. Por lo tanto, la inclusión de dosis más bajas de conjugado de Hib en una vacuna conjugada combinada proporcionó resultados superiores.

10

La administración conjunta de Hib-MenCY con Infanrix penta y Prevenar™ produjo resultados satisfactorios.

Ejemplo 5b Efecto de administración conjunta de HibMenCY con Prevenar™ sobre la respuesta de polisacáridos neumocócicos

Un aspecto adicional del estudio del ejemplo 3 fue investigar el nivel de anticuerpos generados frente a los 7 polisacáridos neumocócicos presentes en la vacuna Prevenar™ con el fin de evaluar el efecto de la administración

15

conjunta de HibMenCY sobre el título de anticuerpo generado frente a polisacáridos neumocócicos.

5 Las CMG y porcentajes de sujetos con anticuerpos para los 7 serotipos neumocócicos $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$ se muestran en la Tabla 8. Excepto para el serotipo 6B, los índices de seropositividad para los componentes 7VPn variaron del 95,5-100% (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$) y del 93,9-100% (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$) a través de los grupos. Para el serotipo 6B, los índices de seropositividad variaron desde 88,4-98,6% (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$) y del 81,2-91,4% (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$) a través de los grupos (grupo ActHIB: 92,3% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$; 86,2% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$).

Tabla 8a Anti-4

Grupo	Nº en grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	CMG ($\mu\text{g/ml}$)
Hib-MenCY 2,5/5/5	69	100%	100%	2,101
Hib-MenCY 5/10/10	70	100%	100%	2,049
Hib-MenCY 5/5/5	69	100%	100%	2,023
Menjugate™	58	3,4%	1,7%	0,024
ActHib™	66	100%	100%	2,062

Tabla 8b Anti-6B

Grupo	Nº en grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	CMG ($\mu\text{g/ml}$)
Hib-MenCY 2,5/5/5	68	95,6%	85,3%	1,060
Hib-MenCY 5/10/10	70	98,6%	91,4%	1,079
Hib-MenCY 5/5/5	69	88,4%	81,2%	0,834
Menjugate™	63	4,8%	1,6%	0,027
ActHib™	65	92,3%	86,2%	0,879

10

Tabla 8c Anti-9V

Grupo	Nº en grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	CMG ($\mu\text{g/ml}$)
Hib-MenCY 2,5/5/5	68	100%	100%	3,102
Hib-MenCY 5/10/10	71	98,6%	97,2%	2,363
Hib-MenCY 5/5/5	71	100%	100%	2,823
Menjugate™	62	4,8%	1,6%	0,028
ActHib™	67	98,5%	98,5%	2,651

Tabla 8d Anti-14

Grupo	Nº en grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	CMG ($\mu\text{g/ml}$)
Hib-MenCY 2,5/5/5	65	100%	98,5%	4,095
Hib-MenCY 5/10/10	65	100%	100%	5,592
Hib-MenCY 5/5/5	68	100%	100%	4,309
Menjugate™	49	49%	14,3%	0,062
ActHib™	65	100%	98,5%	4,372

Tabla 8e Anti-18C

Grupo	Nº en grupo	% ≥ 0,05 µg/ml	% ≥ 0,2 µg/ml	CMG (µg/ml)
Hib-MenCY 2,5/5/5	67	98,5%	98,5%	3,518
Hib-MenCY 5/10/10	71	100%	98,6%	2,969
Hib-MenCY 5/5/5	72	100%	100%	2,936
Menjugate™	65	7,7%	3,1%	0,029
ActHib™	67	98,5%	97%	3,326

Tabla 8f Anti-19F

Grupo	Nº en grupo	% ≥ 0,05 µg/ml	% ≥ 0,2 µg/ml	CMG (µg/ml)
Hib-MenCY 2,5/5/5	65	100%	100%	2,303
Hib-MenCY 5/10/10	67	98,5%	98,5%	1,846
Hib-MenCY 5/5/5	66	100%	100%	2,061
Menjugate™	56	12,5%	3,6%	0,030
ActHib™	65	100%	96,9%	1,881

Tabla 8g Anti-23F

Grupo	Nº en grupo	% ≥ 0,05 µg/ml	% ≥ 0,2 µg/ml	CMG (µg/ml)
Hib-MenCY 2,5/5/5	66	98,5%	97%	2,581
Hib-MenCY 5/10/10	68	97,1%	94,1%	2,112
Hib-MenCY 5/5/5	70	95,7%	95,7%	2,098
Menjugate™	59	5,1%	0,0%	0,027
ActHib™	66	95,5%	93,9%	1,988

5 Conclusión

La administración conjunta de las tres formulaciones de HibMenCY con Prevenar condujo a respuestas inmunes satisfactorias frente a los siete serotipos neumocócicos. El serotipo 6B es un inmunógeno que presenta dificultad para generar una respuesta frente al mismo. En el caso de 6B, se consiguió una CMG más elevada y un porcentaje de sujetos que conseguían los dos niveles de umbral usando las formulaciones de dosis de Hib más bajas de HibMenC. Por lo tanto los usos de vacunas conjugadas de Hib de dosis más baja para administración conjunta con conjugados de polisacárido neumocócico conducen a una mejor respuesta frente al antígeno 6B.

Ejemplo 6 – Ensayo clínico de fase II administrando Hib MenCY simultáneamente con Infanrix penta de acuerdo con un programa de 2, 3 y 4 meses

Diseño de estudio: Un estudio multicentro controlado de Fase II, abierto (parcialmente doble-ciego*) aleatorizado con 5 grupos recibiendo un programa primario de tres dosis con vacunas de la forma siguiente:

Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5 : Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix™ penta

Grupo Hib-MenCY 5/10/10 : Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ penta

Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ penta

Grupo Hib-MenC: Hib-MenC (5/5) + Infanrix™ penta

20 Grupo Menjugate : Menjugate™** + Infanrix™ hexa (control)

* Hib-MenCY 2,5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 y Hib-MenC se administraron de una manera de doble-ciego mientras que el grupo de Hib-MenCY 5/5/5 y el grupo Menjugate eran abiertos.

5 **Menjugate™ fue la vacuna que se administró a todos los sujetos en el grupo. Vacunación a +/- 2, 3, 4 meses de edad (Mes de Estudio 0, Mes 1 y Mes 2) y muestras de sangre (3,5 ml) de todos los sujetos antes de y un mes después de la vacunación primaria (Mes de Estudio 0 y Mes 3).

Vacuna de estudio, dosis, modo de administración, número de lote: Tres dosis se inyectaron por vía intramuscular a intervalos de un mes, a aproximadamente 2, 3 y 4 meses de edad de la manera siguiente:

Tabla 8: Vacunas administradas (estudio y control), grupo, programa/sitio y dosis

Grupo	Programa (meses de edad)	Dosis de vacuna administrada Sitio-Muslo superior izquierdo	Vacuna simultánea administrada Sitio Muslo superior derecho
Hib-MenCY 2,5/5/5	2, 3 y 4	Hib (2,5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/10/10	2, 3 y 4	Hib (5 µg)-MenC-TT (10 µg)-MenY-TT (10 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3 y 4	Hib (5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenC	2, 3 y 4	Hib (5 µg)-Men C (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Menjugate™	2, 3 y 4	Menjugate™	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ hexa)

10 **Inmunogenicidad:** Medición de títulos/concentraciones de anticuerpo frente a cada antígeno de vacuna:

Antes de la primera dosis (Mes 0) y aproximadamente un mes después de la tercera dosis (Mes 3) en todos los sujetos para: SBAMenC y SBA-MenY, anti-PSC y anti-PSY, anti-PRP, anti-T, anti-FHA, anti-PRN y anti-PT. Uso de actividad bactericida en suero frente a serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (punto de corte de SBA-MenC y SBA-MenY: 1:8 y 1:128); ensayos de ELISA con puntos de corte: $\geq 0,3$ µg/ml y ≥ 2 µg/ml para anti-polisacáridos de serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (anti-IgG de PSC y anti-IgG de PSY); $\geq 0,15$ µg/ml y $\geq 1,0$ µg/ml para polirribosil-ribitol-fosfato polisacárido de Hib (anti-IgG de PRP); 5 EL.U/ml para anti-FHA, anti-PRN, anti-PT; $\geq 0,1$ UI/ml de anti-toxoide tetánico (anti-TT). Únicamente a un mes después de la tercera dosis (Mes 3) en todos los sujetos para: anti-D, anti-HBs y anti-polio 1, 2 y 3. Uso de ensayos de ELISA con puntos de corte: 0,1 UI/ml para anti-difteria (anti-D); ≥ 10 mUI/ml para antihepatitis B (anti-HBs); y punto de corte de ensayo de microneutralización: 1:8 para anti-polio de tipo 1, 2 y 3 (anti-polio 1, 2 y 3).

Métodos estadísticos:

Los índices de seroprotección/seropositividad y concentraciones/títulos medios geométricos (CMG/TMG) con intervalos de confianza del 95% (IC 95%) se calcularon por grupo para SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY, anti-PRP, anti-Tétano, anti-PT, anti-FHA y anti-PRN antes de y un mes después de la vacunación; para anti-Difteria, anti-HBs, anti-Polio 1, anti-Polio 2 y anti-Polio 3 un mes después de vacunación. La respuesta de vacuna (aparición de anticuerpos en sujetos inicialmente seronegativos o al menos el mantenimiento de concentraciones de anticuerpo en sujetos inicialmente seropositivos) con IC del 95% para anti-PT, anti-PRN y anti-FHA también se calcularon un mes después de la vacunación. También se presentaron las curvas acumulativas inversas para cada anticuerpo el Mes 3. Las diferencias entre los grupos de Hib-MenCY y Hib-MenC, en comparación con el grupo de control Menjugate™ se evaluaron de una manera exploratoria para cada anticuerpo, excepto para SBA-MenY y anti-PSY, en términos de (1) la diferencia entre el grupo Menjugate™ (menos) los grupos Hib-MenCY y Hib-MenC para el porcentaje de sujetos por encima de los puntos de corte especificados o con una respuesta de vacuna con sus IC del 95% asintóticos estandarizados, (2) las proporciones de CMG o TMG del grupo Menjugate™ con respecto a los grupos Hib-MenCY y Hib-MenC con sus IC del 95%. Las mismas comparaciones se realizaron para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones de Hib-MenCY para anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY y anti-TT.

Las incidencias globales de síntomas solicitados locales y generales se calcularon por grupo de acuerdo con el tipo

ES 2 377 075 T3

síntoma, su intensidad y relación con la vacunación (como porcentajes de sujetos que informaban síntomas generales, locales y de cualquier tipo solicitados dentro de los 8 días a continuación de la vacunación y su IC del 95% exactamente). Las incidencias de síntomas no solicitados se calcularon por grupo. Para los síntomas de Grado 3, se proporcionaron aparición ≤ 48 horas, atención médica, duración, relación con la vacunación y resultados. Los Acontecimientos Adversos Graves se describieron completamente.

5

Índices de seroprotección/seropositividad y CMG/T (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

Tabla 9a Anti – PRP ($\mu\text{g/ml}$)

Grupo	N	% $\geq 0,15$	LI	LS	≥ 1	LI	LS	CMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	64	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,01	7,25	11,21
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,49	7,72	11,65
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	98,6	92,3	100,0	8,08	6,53	9,98
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	98,6	92,7	100,0	10,44	8,49	12,83
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	80,3	69,1	88,8	2,60	1,97	3,43

Tabla 9b SBA - MenC (Título)

Grupo	N	% $\geq 1:8$	LI	LS	$\geq 1:128$	LI	LS	TMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	70	100,0	94,1	100,0	95,7	88,0	99,1	1005,8	773,5	1308,0
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	94,0	85,4	98,3	1029,8	799,7	1326,0
Hib MenCY 5/5/5	71	100,0	94,9	100,0	94,4	86,2	98,4	906,9	691,3	1189,8
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	95,9	88,6	99,2	871,0	677,3	1120,0
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	3557,6	2978,8	4248,8

10

Tabla 9c Anti-PSC ($\mu\text{g/ml}$)

Grupo	N	% $\geq 0,3$	LI	LS	≥ 2	LI	LS	CMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	60	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	21,70	18,36	25,65
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	27,26	23,26	31,95
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	19,02	16,49	21,93
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	100,0	95,1	100,0	21,8	18,24	24,35
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	38,49	33,64	44,05

Tabla 9d SBA - MenY (Título)

Grupo	N	% $\geq 1:8$	LI	LS	$\geq 1:128$	LI	LS	TMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	69	97,1	89,9	99,6	92,8	83,9	97,6	470,7	351,1	631,2
Hib MenCY 5/10/10	66	97,0	89,5	99,6	86,4	75,7	93,6	437,1	322,0	593,4.8
Hib MenCY 5/5/5	71	98,6	92,4	100,0	95,8	88,1	99,1	635,3	501,5	804,8
Hib MenC	74	21,6	12,9	32,7	13,5	6,7	23,5	9,3	6,3	13,7
Menjugate™	71	19,7	11,2	30,9	9,9	4,1	19,3	7,5	5,4	10,4

Tabla 9e Anti - PSY (µg/ml)

Grupo	N	%≥0,3	LI	LS	≥2	LI	LS	CMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	26,86	22,86	31,56
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	37,02	31,84	43,04
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	23,57	19,94	27,86
Hib MenC	74	8,1	3,0	16,8	4,1	0,8	11,4	0,19	0,15	0,25
Menjugate™	71	5,6	1,5	13,8	1,4	0,0	7,6	0,17	0,15	0,19

Tabla 9e Anti-tétano (UI/ml)

Grupo	N	%≥0,1	LI	LS	CMG	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	68	100,0	94,7	100,0	3,06	2,63	3,55
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	3,25	2,88	3,68
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	2,9	2,59	3,41
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	3,15	2,73	3,64
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	1,66	1,39	1,97
<p>Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix™ penta</p> <p>Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ penta</p> <p>Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ penta</p> <p>Grupo Hib-MenC: Hib-Men (5/5)+ Infanrix™ hexa</p> <p>Grupo Menjugate: Menjugate™ + Infanrix™ penta</p> <p>N = número de sujetos con resultados disponibles. % = porcentaje de sujetos con concentración/título dentro del intervalo especificado</p> <p>CMG/T: concentración/título medio geométrico IC del 95% = intervalo de confianza del 95%;</p> <p>LI = Límite Inferior; LS = Límite Superior</p>							

5 Conclusión

Las respuestas inmunes frente a Hib y MenC fueron superiores usando dos formulaciones con dosis reducidas de Hib. Para MenY, se observó una respuesta de SBA mejorada usando las formulaciones 2,5/5/5 y 5/10/10 en comparación con la formulación 5/5/5.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica para administración a un ser humano que comprende un conjugado de sacárido Hib, al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional y un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en pertussis de célula completa y antígeno de superficie de hepatitis B, en la que la dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib es menor de 5 µg.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 en la que la dosis de sacárido del o de cada uno del al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional, por ejemplo, *N. meningitidis*, es menor de 6 µg.
- 10 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 ó 2 en la que el al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano adicional comprende un sacárido capsular de *N. meningitidis* obtenido a partir de una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en los serogrupos A, B, C, W135 e Y.
4. La composición inmunogénica de la reivindicación 3 que comprende sacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC).
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 3 ó 4 que comprende sacárido capsular de serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA).
- 15 6. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 que comprende sacárido capsular de serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY).
7. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6 que comprende sacárido capsular de serogrupo W135 de *N. meningitidis* (MenW).
8. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que comprende TD, TT, Pw y HepB.
- 20 9. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que comprende una preparación de vesícula de membrana exterior de serogrupo B de *N. meningitidis*.
10. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que comprende un sacárido capsular de *S. pneumoniae* obtenido a partir de una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.
- 25 11. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que comprende un sacárido capsular Vi de *S. typhi*.
12. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que se usa la misma proteína transportadora en el conjugado de Hib y el o cada uno del al menos un conjugado o conjugados de sacárido de *N. meningitidis*.
- 30 13. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que el sacárido Hib se conjuga con una proteína transportadora seleccionada entre el grupo que consiste en TT, TD, CRM197, fragmento C de TT, proteína D, OMPC y pneumolisina.
14. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que el o cada uno del al menos un sacárido o sacáridos de *N. meningitidis* se conjuga a una proteína transportadora seleccionada entre el grupo que consiste en TT, TD, CRM197, fragmento C de TT, proteína D, OMPC y pneumolisina.
- 35 15. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que la proporción de Hib a proteína transportadora en el conjugado de sacárido Hib está entre 1:5 y 5:1, 1:1 y 1:4, 1:2 y 1:3,5 o aproximadamente 1:3 (p/p).
16. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que el sacárido MenA, cuando está presente, tiene un peso molecular de por encima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa o un tamaño promedio de entre 50-100 kDa, 55-90 kDa o 60-80 kDa.
- 40 17. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que el sacárido MenC, cuando está presente, tiene un peso molecular de por encima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa o un tamaño promedio de entre 100-200 kDa, 100-150 kDa o 150-200 kDa.
- 45 18. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que MenC, cuando está presente, está al menos parcialmente O-acetilado, de forma que al menos el 30% de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una posición.
19. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que MenA, cuando está presente, está al menos parcialmente O-acetilado, de forma que al menos el 50% de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una posición.
- 50

20. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que el conjugado de sacárido Hib y el al menos un conjugado o conjugados de sacárido de *N. meningitidis* no está adsorbidos en sales de aluminio.
21. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que no tiene adyuvante.
- 5 22. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
23. Un kit de vacuna para administración simultánea o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un huésped frente a enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Haemophilus influenzae*, comprendiendo dicho kit un primer recipiente que comprende:
- 10 toxoide tetánico (TT), y
- toxoide de difteria (TD), y
- componentes de pertussis de célula completa y/o antígeno de superficie de hepatitis B;
- y un segundo recipiente que comprende una composición inmunogénica que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21.
- 15 24. El kit de vacuna de la reivindicación 23 en el que el primer recipiente comprende además antígeno de superficie de hepatitis B adsorbido en fosfato de aluminio.
25. El kit de vacuna de la reivindicación 23 ó 24 en el que el primer o segundo recipiente comprende además virus de polio inactivado (IPV).
- 20 26. Un procedimiento para preparar la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21 que comprende la etapa de mezclar un conjugado de sacárido Hib con al menos un conjugado o conjugados de sacárido bacteriano y un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en pertussis de célula completa y antígeno de superficie de hepatitis B para formar una composición en la que la dosis del sacárido del conjugado de sacárido Hib es menor de 5 µg y la dosis de sacárido del o cada uno del al menos un conjugado o conjugados de sacárido adicional es menor de 6 µg.
- 25 27. La composición inmunogénica, vacuna o kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para su uso en el tratamiento o prevención de meningitis.
28. La composición inmunogénica, vacuna o kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad causada por *Haemophilus influenzae*.