

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 582**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07803334 .7**
96 Fecha de presentación: **07.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2097102**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **Vacuna de combinación con cantidades reducidas del antígeno del virus de la polio**

30 Prioridad:
07.09.2006 GB 0617602
21.12.2006 GB 0625593

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.09.2012

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

72 Inventor/es:
DE HEMPTINNE, Hervé;
DUCHENE, Michel;
MARY, Anne y
SONVEAUX, Marc

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 387 582 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de combinación con cantidades reducidas del antígeno del virus de la polio

Campo de la invención

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

Antecedentes

10 Las vacunas de combinación (que proporcionan protección contra múltiples patógenos) son muy deseables para minimizar el número de inmunizaciones requeridas para conferir protección contra múltiples patógenos, para disminuir los costes de administración y para incrementar la aceptación y las tasas de cobertura. El fenómeno bien documentado de la competición (o interferencia) antigénica complica el desarrollo de vacunas de múltiples componentes. La interferencia antigénica se refiere a la observación de que administrar múltiples antígenos a menudo tiene como resultado una disminución de la respuesta a ciertos antígenos respecto a la respuesta inmunitaria observada cuando dichos antígenos se administran de forma individual.

15 Se conocen vacunas de combinación que pueden prevenir la infección por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y, opcionalmente, poliovirus inactivados (IPV), y/o por el virus de la hepatitis B y/o por Haemophilus tipo B (véase, por ejemplo, los documentos WO 93/24148, WO97/00697 y WO2000/030678).

20 Tras muchos años de investigación, la dosis estándar de las vacunas de la polio aceptadas como eficaces en la comunidad de las vacunas hoy en día contiene 40 unidades del antígeno D del poliovirus inactivado de tipo 1 (Mahoney), 8 unidades del antígeno D del poliovirus inactivado de tipo 2 (MEF-1) y 32 unidades del antígeno D del poliovirus inactivado de tipo 3 (Saukett) (p. ej.,. *Infanrix-IPV™*). Herremans y col. (1999), *The Journal of Immunology*, 162:5011-5018 divulgan una vacuna de IPV en la que los serotipos 1, 2 y 3 presentes en las cantidades siguientes, respectivamente: 40, 4 y 7,5 unidades del antígeno D. En Doi y col. (2001), Brown F (ed): *Progress in Polio Eradication: Vaccine strategies for the End Game*, Dev Biol. Basel, Karger, 105:163-169, la potencia de S-IPV producidos en células Vero infectados con la cepa Sabin se analizó en ratas. El IPV de tipo 1 se analizó a 11 y 32 unidades del antígeno D con 30 unidades del antígeno D seleccionado para posteriores ensayos con seres humanos.

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

Sumario de la invención

30 De acuerdo con esto, la presente divulgación idea varias vacunas de IPV de dosis reducida (que pueden tener solo componentes del IPV o pueden tener componentes del IPV combinados con otros antígenos).

35 De acuerdo con esto, un aspecto de la presente divulgación es una vacuna del IPV que comprende poliovirus inactivado de tipo 1 a una dosis superior a 10 unidades del antígeno D e inferior a 20 unidades del antígeno D, por ejemplo 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 unidades de antígeno D.

Una realización divulgada en el presente documento es una vacuna del IPV que comprende poliovirus inactivado de tipo 3 a una dosis de 8-20 unidades del antígeno D, por ejemplo de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de antígeno D.

40 En otra realización, la presente divulgación contempla una vacuna del IPV que comprende poliovirus inactivado de tipo 2 a una dosis de 2-4 unidades del antígeno D, por ejemplo de 2, 3 o 4 unidades de antígeno D.

En una realización adicional, se divulga una vacuna del IPV que además comprende el toxoide de la difteria y/o el toxoide del tétanos y/o la vacuna de la tos ferina en forma de vacuna Pw de células enteras muertas o antígenos de pertussis acelulares.

45 En un aspecto adicional, la presente divulgación incluye una vacuna del IPV que es una vacuna de combinación DTP-IPV libre de tiomersal que comprende el poliovirus tipo 1 inactivado a una dosis de entre 10 y 36 unidades de antígeno D.

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

50 En otra realización, se divulga una vacuna de combinación DTP-IPV libre de tiomersal que comprende poliovirus inactivado de tipo 3 a una dosis de 8-29 unidades del antígeno D, por ejemplo de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 unidades de antígeno D.

En una realización adicional, las vacunas de la presente divulgación también pueden comprender uno o más antígenos seleccionados del grupo constituido por: antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno(s) de *Haemophilus influenzae* b, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* A, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* C, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* W, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* Y, vesículas de membrana externa o antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* B, antígeno(s) de la hepatitis A y antígeno(s) de *Salmonella typhi*, en particular, sacáridos capsulares antigénicos de dichas bacterias.

Se proporciona un procedimiento de fabricación de una vacuna de combinación para inmunizar un huésped humano, en el que la vacuna comprende toxoide de difteria, toxoide del tétanos y poliovirus inactivado de tipo 1 a una dosis superior a 10 unidades del antígeno D e inferior a 20 unidades del antígeno D.

10 **Definiciones**

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

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

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

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

Los términos “lipopolisacárido” (LPS) y “lipooligosacárido” (LOS) son intercambiables.

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

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

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

Los términos “alrededor de” o “aproximadamente” se toman en el presente documento en el sentido de indicar ± 10 % del valor indicado, pero deben estar en consonancia con el contexto de uso.

Descripción de las figuras

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

Se examinó la potencia de la vacuna IPV de dosis reducida de las formulaciones del “Método de producción 3” in

vivo en comparación con la formulación de referencia (formulación Poliorix y DTPaIPVHB). Se midió la PR del IPV a dosis del 100 %, 50 %, 25 % y 12,5 % de la dosis estándar del IPV (40/8/32 unidades de antígeno D para los tipos 1/2/3).

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

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

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

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

Descripción detallada

15 La presente divulgación se refiere a una vacuna (p. ej., una vacuna de combinación) que comprende antígenos del poliovirus (IPV) y, opcionalmente, de *Corynebacterium diphtheriae* (D), *Clostridium tetani* (T), *Bordetella pertussis* (P) o de la Hepatitis B.

Los antígenos de las vacunas divulgadas

Componentes de la vacuna IPV

20 Las vacunas divulgadas en el presente documento pueden estar compuestas por IPV tipo 1 o IPV tipo 2 o IPV tipo 3 o IPV tipos 1 y 3 o IPV tipos 2 y 3 o IPV tipos 1, 2 y 3.

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

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

35 El poliovirus puede cultivarse en cultivos celulares. El cultivo celular puede ser una línea de células VERO o PMKC, que es una línea celular continua derivada de riñón de mono. Las células VERO pueden cultivarse de manera conveniente en microvehículos. El cultivo de las células VERO antes y durante la infección viral puede implicar el uso de materiales de origen bovino, como el suero de ternera, y este material debe obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). El cultivo puede también implicar materiales tales como hidrolizado de lactoalbúmina. Después del crecimiento, los viriones pueden purificarse mediante técnicas tales como ultrafiltración, diafiltración y cromatografía. Antes de la administración a los pacientes, los virus deben ser inactivados y esto se puede lograr mediante tratamiento con formaldehído.

40 Los virus pueden cultivarse, inactivarse y purificarse por separado y, a continuación, combinarse para dar una mezcla concentrada a granel para su uso en la vacuna IPV o para la adición a los componentes adsorbidos de la difteria, el antígeno tetánico y los componentes de pertussis para vacunas que comprenden DTPw-IPV o DTPa-IPV.

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

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

Sin embargo, los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que se puede usar dosis reducidas de IPV para obtener una buena respuesta inmunitaria. En una realización de la divulgación, una dosis de la vacuna del IPV puede comprender entre 10 y 36 unidades del antígeno D del IPV de tipo 1 (por ejemplo 11, -32, 12-28, 13-24, 14-20 o 15-19 unidades de antígeno D). En otra realización, divulgación, una dosis de la vacuna del IPV puede comprender el IPV de tipo 1 a una dosis de 10-20 unidades del antígeno D o una dosis superior a 10 unidades del antígeno D y menos de 20 unidades del antígeno D. En otra forma de realización, una dosis de la vacuna puede comprender el 26-49 %, 30-45 %, 33-40 %, 35-37 %, o aproximadamente o exactamente un tercio de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D de IPV tipo 1 (equivalente a aproximadamente 10,4-19,6, 12-18, 13,2-16, 14-14,8 o 13,3 unidades de antígeno D). En otra realización, una dosis de la vacuna del IPV puede comprender 11-32 unidades de antígeno D, 12-28 unidades de antígeno D, 13-24 unidades de antígeno D o 14-20 unidades de antígeno D del IPV de tipo 1.

Como alternativa, una dosis de la vacuna del IPV puede comprender 10-19,5 unidades de antígeno D, 12-19 unidades de antígeno D, 14-18,5 unidades de antígeno D o 15-17 unidades de antígeno D; por ejemplo de alrededor de o exactamente 16 unidades de antígeno D del IPV de tipo 1.

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

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

En una realización adicional, las vacunas divulgadas en el presente documento pueden comprender 2-7 unidades de antígeno D de IPV tipo 2. En otra forma de realización, una dosis de la vacuna IPV puede comprender 3-6 unidades de antígeno D o 4-5 unidades de antígeno D de IPV tipo 2.

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

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

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

En una forma de realización adicional, una vacuna del IPV puede comprender 8-29 unidades de antígeno D, 9-26 unidades de antígeno D, 10-23 unidades de antígeno D, 11-20 unidades de antígeno D, 12-17 unidades de antígeno D o 13-14 unidades de antígeno F del IPV de tipo 3.

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

Componentes de la vacuna DTP

Las vacunas DTP son vacunas muy conocidas que se usan para prevenir o tratar la difteria, el tétanos y la enfermedad causada por *B. pertussis*. Las vacunas divulgadas en el presente documento pueden comprender componente(s) de la difteria, el tétanos y/o pertussis.

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

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

El componente de pertussis puede ser acelular (Pa), en los casos en que se usan antígenos de pertussis purificados, o de células enteras (Pw), en los casos en que se usan células de pertussis enteras muertas como componente de pertussis. El componente Pw puede ser inactivado por varios procedimientos conocidos, incluyendo los procedimientos sin mercurio. Tales procedimientos pueden incluir calor (por ejemplo, 55-65 °C o 56 - 60 °C, durante 5-60 minutos o durante 10-30 minutos, por ejemplo, 60 °C durante 30 minutos), formaldehído (por ejemplo, al 0,1 % a 37 °C, 24 horas), glutaraldehído (por ejemplo, al 0,05 % a temperatura ambiente, 10 minutos), acetona-I (por ejemplo, tres tratamientos a temperatura ambiente) o acetona-II (por ejemplo, tres tratamientos a temperatura ambiente y el cuarto tratamiento a 37 °C), inactivación (véase, por ejemplo, Gupta y col., 1987, J. Biol Stand 15:87; Gupta y col., 1986, Vaccine, 4:185). Los procedimientos de preparación de células enteras de *Bordetella pertussis* muertas (Pw) adecuadas para usar en las vacunas se divulgan en el documento WO 93/24148, ya que son procedimientos de formulación adecuados para la producción de vacunas DT-TT-Pw-HepB. El tiomersal se ha usado en el pasado en la preparación de células enteras de *Bordetella pertussis* muertas (véase a continuación). No obstante, en una realización no se usa en el procedimiento de formulación de las vacunas divulgadas en el presente documento.

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

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

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

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

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

En una forma de realización, el componente de pertussis puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el componente de pertussis puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, el componente de pertussis puede ser adsorbido sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Por ejemplo, en una forma de realización, al menos la PRN es adsorbida sobre hidróxido de aluminio con PT/FHA adsorbidos sobre hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o una mezcla de ambos.

Otros antígenos

Las formulaciones de vacunas divulgadas en el presente documento, que también comprenden DTP (DTPw o DTPa), pueden también comprender uno o más antígenos seleccionados del grupo constituido por: antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno(s) de *Haemophilus influenzae* b, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* A, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* C, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* W-135, antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* Y, vesículas de membrana externa o antígeno(s) de *Neisseria meningitidis* B, antígeno(s) de la hepatitis

A y antígeno(s) de *Salmonella typhi*, y RTS.S. Normalmente, se pueden usar los sacáridos capsulares o antígenos LOS de estos patógenos. Los antígenos normalmente estarán presentes en una concentración de al menos 1 µg/ml de cada uno, por ejemplo, 1-20 µg/ml, 2-15 µg/ml, 2,5-10 µg/ml, 3-8 µg/ml o 4-6 µg/ml. En general, la concentración de cualquier antígeno será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno. Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos individuales no se elimina al combinarlos, aunque la inmunogenicidad real (p. ej., los títulos en ELISA) se puede reducir.

Los otros antígenos pueden, en una forma de realización de la invención, ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, los otros antígenos de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, los otros antígenos pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio o pueden estar sin adsorber.

En los casos en que se usa un antígeno de sacárido capsular o un antígeno LOS, el mismo puede conjugarse con una proteína portadora que comprende epítomos de células T colaboradoras con el fin de potenciar la inmunogenicidad. La invención también puede comprender "proteínas portadoras" libres.

Como una alternativa al uso de antígenos proteicos en las composiciones que se dan a conocer en el presente documento, puede usarse el ácido nucleico que codifica el antígeno. Los componentes proteicos de las composiciones pueden, por consiguiente, ser reemplazados por el ácido nucleico (por ejemplo ADN, que puede estar en forma de un plásmido) que codifica la proteína. De forma similar, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden comprender proteínas que imitan antígenos sacáridos, por ejemplo mimotopos [130] o anticuerpos anti-idiotipo. Estos pueden reemplazar los componentes sacáridos individuales o pueden complementarlos.

Antígeno de la hepatitis B

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

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

El AgHBs puede estar en forma de partículas. Las partículas pueden comprender, por ejemplo, la proteína S sola o pueden ser partículas compuestas, por ejemplo (L*, S), en las que L* es como se ha definido en lo que antecede y s indica la proteína S del AgHBs. Dicha partícula está, de forma ventajosa en la forma en la que se expresa en levaduras.

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

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

El antígeno de superficie de la hepatitis B puede ser adsorbido sobre fosfato de aluminio, procedimiento que se puede realizar antes de mezclarlo con los otros componentes (descrito en el documento WO93/24148). El

componente de hepatitis B debe estar sustancialmente libre de tiomersal (el procedimiento de preparación de AgHBs sin tiomersal se ha publicado previamente en el documento EP 1307473).

Antígeno(s) de *Haemophilus influenzae* b

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

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

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

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

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

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

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

25 Las vacunas divulgadas en el presente documento pueden comprender además un sacárido capsular de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *N. meningitidis* tipo A (MenA, opcionalmente conjugado con una proteína portadora), *N. meningitidis* tipo C (MenC, opcionalmente conjugado con una proteína portadora), *N. meningitidis* tipo W-135 (MenW, opcionalmente conjugado con una proteína portadora) y *N. meningitidis* tipo Y (MenY, opcionalmente conjugado con una proteína portadora).

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

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

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

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

40 Las vacunas divulgadas también pueden comprender un componente de MenB tal como una vesícula o ampolla de membrana externa como se describe en los documentos WO 01/09350, WO 03/105890, WO 04/014417 o WO 8 04/014418 o un antígeno sacárido capsular de MenB conjugado (o derivado del mismo) (por ejemplo, véase el documento WO 96/40239) o un LOS meningocócico L2 o L3 o L2 y L3 libre o conjugado (según el documento WO 2004/014417). En una forma de realización, el (los) componente(s) de MenB pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el (los) componente(s) de MenB pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, el (los) componente(s) de MenB pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En una forma de realización, el (los) componente(s) de MenB pueden no estar adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio adyuvante.

Antígeno(s) de *Salmonella typhi*

Las vacunas de la invención pueden comprender además el sacárido Vi de *Salmonella typhi*, que puede ser el producto registrado Typherix®, que se describe en el documento EP 1107787, o un conjugado del mismo (por

ejemplo, con una proteína portadora, como se describe en el presente documento). El proceso de conjugación puede llevarse a cabo como se describe en el documento WO 2007/000343. En una forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. En una forma de realización, el (los) sacárido(s) Vi pueden no estar adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio adyuvante.

Antígeno(s) del virus de la hepatitis A

El componente que confiere protección contra la hepatitis A puede ser una vacuna atenuada inactivada de hepatitis A, por ejemplo el producto conocido como Havrix™ (marca registrada de Glaxo SmithKline Biologicals S.A.), que es una vacuna atenuada inactivada derivada de la cepa HM-175 del virus de hepatitis A (VHA) (véase "Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A-2 de F.E. Andre y col., 1980, Prog. Med. Virol. 37:72 y la monografía del producto "Havrix" publicada por SmithKline Beecham Biologicals 1991). Flehmig y col. (1990, Prog. Med. Virol. han revisado los aspectos clínicos, virología, inmunología y epidemiología de la hepatitis A y han tratado los abordajes al desarrollo de vacunas contra esta frecuente infección vírica. Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "antígeno de VHA" se refiere a cualquier antígeno capaz de estimular anticuerpos neutralizantes frente al VHA en seres humanos. En una realización, el antígeno del VHA comprende partículas víricas atenuadas inactivadas o, en otra realización, puede ser una cápside de VHA o proteína viral del VHA, que puede obtenerse, convenientemente, mediante tecnología de ADN recombinante. En una forma de realización, el componente de hepatitis A puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, el componente de hepatitis A puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En otra forma de realización, el componente de hepatitis A puede ser adsorbido sobre una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

Antígeno(s) de la malaria

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

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

Conjugados

Los conjugados de sacáridos capsulares bacterianos pueden comprender cualquier péptido, polipéptido o proteína portadora(s) que comprenda al menos un epítipo de célula T colaboradora. La(s) proteína(s) portadora(s) se pueden seleccionar del grupo constituido por: toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM 197, toxina recombinante de la difteria (como se describe en cualquiera de los documentos US 4.709.017, WO 93/25210, WO 95/33481 o WO 00/48638), neumolisina (opcionalmente destoxificada por medios químicos o un mutante destoxificado) de *S. p. pneumoniae* (véase, por ejemplo documento WO 2004/081515 y las referencias que en figuran en el mismo), OMPC de *N. meningitidis* (documento EP 0372501) y proteína D (PD) de *H. influenzae* (documento EP 594610). Otros vehículos pueden incluir péptidos sintéticos (documentos EP 0378881, EP 0427347), proteínas del shock térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668, EP 0471177), citocinas (documento WO 91/01146), linfoquinas (documento WO 91/01146), hormonas (documento WO 91/01146), factores de crecimiento (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprende múltiples epítopos de células T CD4 + humanas de diversos antígenos derivados de agentes patógenos (Falugi y col., 2001, Eur. J. Immunol. 31: 3816), proteína de superficie neumocócica PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), PhtD de neumococo (documento WO 00/37105), PhtDE de neumococo (por ejemplo, documentos WO 01/98334 y WO 03/054007), PhtX, etc.

Todos los sacáridos pueden estar en el mismo vehículo, en especial todos los sacáridos de un organismo, por ejemplo, los sacáridos de MenA, MenC, MenW y MenY se pueden conjugar todos con TT, DT o CRM 197. Sin embargo, debido al conocido efecto de supresión del vehículo, puede ser ventajoso que en cada una de las composiciones de la invención los antígenos sacáridos contenidos en la misma ("n" antígenos) se conjuguen con más de un vehículo. Por lo tanto, (n-1) de los sacáridos podrían ser transportados (por separado) en un tipo de

vehículo, y 1 en un vehículo diferente, o (n-2) en uno, y dos en dos vehículos diferentes, etc. Por ejemplo, en una vacuna que contiene cuatro conjugados de sacáridos bacterianos, 1, 2 o los cuatro pueden conjugarse con diferentes vehículos). La proteína D, sin embargo, puede usarse para diversos (2, 3, 4 o más) sacáridos en una composición sin que se produzca un marcado efecto de supresión del vehículo. Hib puede estar presente como un conjugado con TT, DT o CRM197, y MenA, MenC, MenY y MenW pueden estar como conjugados con TT, DT, CRM197 o PD. Vi puede estar presente como un conjugado con TT, DT o CRM197. La proteína D es un vehículo útil, ya que proporciona un antígeno adicional que puede proporcionar protección frente a *H. influenzae*. En una forma de realización, todos los sacáridos se conjugan con la misma proteína portadora.

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

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

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

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

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

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

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

Adyuvantes

Las vacunas divulgadas pueden incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un adyuvante adecuado. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como el hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, o puede ser un sacárido catiónicamente o aniónicamente derivatizado, polifosfacenos, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A (MPL), derivados de lípido A (por ejemplo, de toxicidad reducida),

MPL 3-O-desacilado, quil A, saponina, QS21, tocol (documento EP 0382271), adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), AS-2 (Smith-Kline Beecham, Philadelphia, PA), oligonucleótidos CpG, bioadhesivos y mucoadhesivos, micropartículas, liposomas, formulaciones de éteres de polioxietileno, formulaciones de ésteres de polioxietileno, péptidos de muramilo o compuestos de imidazoquinolona (por ejemplo, imiquamod y sus homólogos). Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), también se pueden usar como adyuvantes el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulante de colonias de granulocitos, macrófagos (GM-CSF).

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

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

Las vacunas divulgadas en el presente documento pueden también comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados con anterioridad.

Cualquier adyuvante puede ser adsorbido por o combinarse con el componente IPV divulgado en el presente documento.

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

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

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

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

Aunque la mayor parte de aluminio es proporcionada por los antígenos preadsorbidos antes de la mezcla para formar una vacuna de combinación, algo de aluminio se pueden añadir en forma libre durante la formulación de la vacuna de combinación divulgada, por ejemplo, antes de la etapa de ajuste del pH que se describe en el presente documento. Por lo general, el contenido de aluminio libre por dosis de 0,5 ml puede ser de 0 a 300 μg , de 50 a 250 μg , de 75 a 200 μg , de 100 a 150 μg o de alrededor de o exactamente 115 μg de Al^{3+} . El Al^{3+} libre puede ser todo $\text{Al}(\text{OH})_3$ o todo AlPO_4 , o una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 en la siguiente relación (Al^{3+} : Al^{3+} p:p): 1:1 1:6, 1:1,1 1:5, 1:1,2 - 1:4, 1:1,3 - 1:3, 1:1,4 - 1:2, por ejemplo, 23/92 o 69/46 o 6:1 - 1:1, 5:1 1,1:1, 4:1 1,2:1, 3:1 1,3:1, 2:1 - 1,4:1, por ejemplo, 46/69 o 92/23.

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

El IPV puede no estar adsorbido o puede estar absorbido en $\text{Al}(\text{OH})_3$, o a una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 . El DT puede estar adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 , el TT puede estar adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 , el Pw puede estar adsorbido sobre o mezclado con AlPO_4 , la PRN pueden estar adsorbida sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$, la FHA pueden estar adsorbida sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$, el PT puede estar adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$, el HB puede estar adsorbido sobre AlPO_4 , el Hib puede estar adsorbido sobre AlPO_4 o puede no estar adsorbido, Men ACWY pueden estar adsorbidos sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 o pueden no estar adsorbidos, el componente MenB puede estar adsorbidos sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 o puede no estar adsorbido, el Vi puede estar adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 o puede no estar adsorbido, el HepA puede estar adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4 .

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

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

El significado de los términos "fosfato de aluminio" e "hidróxido de aluminio", como se usan en la presente memoria descriptiva, incluyen todas las formas de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio que son adecuados para adyugar vacunas. Por ejemplo, el fosfato de aluminio puede ser un precipitado de fosfato de aluminio insoluble (amorfo, semicristalino o cristalino), que opcionalmente, pero no exclusivamente, se puede preparar mezclando sales de aluminio y sales de ácido fosfórico solubles. El "hidróxido de aluminio" puede ser un precipitado de hidróxido de aluminio insoluble (amorfo, semicristalino o cristalino), que opcionalmente, pero no exclusivamente, se puede preparar neutralizando una solución de sales de aluminio. Particularmente adecuadas son las diversas formas de geles de hidróxido de aluminio y de fosfato de aluminio disponibles de fuentes comerciales, por ejemplo Alhydrogel (hidróxido de aluminio, suspensión al 3 % en agua) y Adju-fos (fosfato de aluminio, suspensión al 2 % en solución salina) suministrados por Brenntag Biosector (Dinamarca).

Componentes no inmunológicos de las vacunas divulgadas

Las vacunas divulgadas en el presente documento comprenderán normalmente, además de los componentes antigénicos y adyuvantes que se mencionaron anteriormente, uno o más "vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier excipiente que no induzca la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Normalmente, los excipientes adecuados son macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col., 2001, Vaccine, 19: 2118), trehalosa (documento WO 00/56365), agregados de lactosa y lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Las vacunas pueden también contener diluyentes tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares. Un vehículo típico es la solución salina fisiológica tamponada con fosfato estéril y sin pirógenos. Se puede encontrar una exhaustiva discusión de excipientes farmacéuticamente aceptables en la referencia Gennaro, 2000: The Science and Practice of Pharmacy, 20 edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones divulgadas puede estar liofilizadas o en forma acuosa, es decir, como soluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas de este tipo permiten administrar las composiciones directamente desde sus formas de presentación, sin la necesidad de reconstitución en un medio acuoso, por lo que son ideales para la inyección. Las composiciones se pueden presentar en viales o se pueden presentar en jeringas ya cargadas. Las jeringas se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis o múltiples dosis (p. ej., 2 dosis). En una realización la dosis es para seres humanos. En otra forma de realización, la dosis es para un ser humano adulto, adolescente, niño, niño pequeño o lactante o menor de un año de edad y puede administrarse mediante inyección.

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

Las vacunas divulgadas en el presente documento pueden envasarse en forma de monodosis o en forma de múltiples dosis (p. ej., 2 dosis). Para las formas de múltiples dosis se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Se pueden establecer volúmenes de dosificación eficaces de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

En una forma de realización, las vacunas divulgadas en el presente documento tienen un pH de entre 6,0 y 8,0, en otra forma de realización, las vacunas tiene un pH de entre 6,3 y 6,9, por ejemplo, $6,6 \pm 0,2$. Las vacunas pueden tamponarse en este pH. El pH puede mantenerse estable por medio del uso de un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se puede usar un tampón de histidina (documento WO 03/009869). La

composición deberá ser estéril y/o apirógena.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

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

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

Las vacunas divulgadas en el presente documento pueden comprender un detergente, por ejemplo un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes, por lo general, están presentes en niveles bajos, por ejemplo <0,01 %.

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

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

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

Propiedades de las vacunas divulgadas

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

Formulaciones de vacuna

En una forma de realización, las vacunas divulgadas se formulan como una vacuna para administración in vivo al huésped, de tal manera que confieran un valor o título de anticuerpos superior al criterio de seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de los seres humanos. Esta es una prueba importante en la evaluación de la eficacia de la vacuna en la población. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado superior a lo que en un huésped se considera seroconversión contra el antígeno son bien conocidos y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. En una forma de realización, más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión, en otra forma de realización, el 13 del 90 % de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión, en una forma de realización más, más del 93 % de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión y en aún otra forma de realización más, del 96 al 100 % de una muestra estadísticamente significativa de los sujetos alcanza la seroconversión.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que incluye una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en los vacunados típicos. Tal cantidad variará en función de qué inmunógenos específicos se emplean. Generalmente cabe esperar que cada dosis comprenda 1-1000 µg de inmunógeno total, o 1-100 µg o 1-40 µg o 1-5 µg. Una cantidad óptima para una vacuna concreta puede determinarse mediante estudios que implican observación de títulos de anticuerpos y otras respuestas en sujetos. Un curso de vacunación principal puede incluir 2 - 3 dosis de vacuna, administradas con una separación de uno a

dos meses, por ejemplo siguiendo las recomendaciones de la OMS para la inmunización de DTP (es decir, en el primer año de vida). Las dosis de refuerzo puede continuar en el segundo año y/o en años posteriores de la vida.

Potencia de poliovirus medida por la prueba de seroneutralización en ratas

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

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

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

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

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

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

Presentación de las vacunas divulgadas

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

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

45 En una forma de realización de este aspecto de la divulgación, se proporciona un kit que comprende dos vacunas multivalentes para conferir protección a un huésped contra la enfermedad causada por el poliovirus, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y, opcionalmente, uno o más de hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, hepatitis A o malaria.

50 El kit comprende un primer recipiente que comprende:

(1)

- (a) virus de la polio inactivados (IPV) de la invención,
- (b) toxoide diftérico (DT o D) (véase anteriormente),
- (c) toxoide tetánico (TT o T) (véase anteriormente),

- (d) células enteras muertas de *Bordetella pertussis* (Pw) o 2 o más componentes acelulares de pertussis (Pa) (véase anteriormente),
 (e) opcionalmente, antígeno de superficie de la hepatitis B (HepB o HB) (véase anteriormente),
 5 (f) opcionalmente, un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib) (véase anteriormente),
 (g) opcionalmente, uno o ambos conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de *N. meningitidis* tipo A (MenA) o *N. meningitidis* tipo C (MenC) (véase anteriormente), y

un segundo recipiente que comprende:

(2A)

- 10 (a) conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de *N. meningitidis* tipo A (MenA), *N. meningitidis* tipo C (MenC), *N. meningitidis* tipo W (MenW) y/o *N. meningitidis* tipo Y (MenY) (véase anteriormente para las diversas combinaciones de sacáridos Men de la invención), y
 (b) opcionalmente, un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib);
 o

15 (2B)

- (a) un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib); y
 (b) opcionalmente, un conjugado de una proteína portadora y el sacárido Vi de *Salmonella typhi*

El kit puede comprender, opcionalmente, un tercer recipiente que comprende:

(3)

- 20 (a) opcionalmente, el antígeno de superficie de la hepatitis B
 (b) opcionalmente, un conjugado de una proteína portadora y el sacárido Vi de *Salmonella typhi*

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

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

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

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

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

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

- 35 Los inventores creen que un kit proporcionado en la forma anterior puede presentar ventajosamente los diversos antígenos al sistema inmunitario del receptor de una manera óptima. El kit puede proporcionar a un médico un procedimiento óptimo para la inmunización de un huésped con una o más de las siguientes ventajas: eficacia de la protección para todos los antígenos, mínima reactogenicidad, mínima interferencia de supresión por el vehículo, mínima interferencia entre adyuvante y antígeno, o mínima interferencia entre antígenos.

- 40 De esta manera, pueden alcanzarse estos objetivos con el número mínimo (dos) de administraciones, realizadas de manera opcional en la misma visita al médico.

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

Preparación de las vacunas divulgadas

En el presente documento también se divulga un procedimiento para producir una formulación de vacuna que comprende la etapa de mezclar los componentes de la vacuna junto con un excipiente farmacéuticamente

aceptable.

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

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

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

20 La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que incluye una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en los vacunados típicos. Tal cantidad variará en función de qué inmunógenos específicos se emplean y de la manera en que se presenten. En una forma de realización, cada dosis comprenderá de 0,1 - 100 µg de sacárido, en otra forma de realización cada dosis comprenderá de 0,1 - 50 µg, en una forma de realización más, cada dosis comprenderá de 0,1 - 10 µg, en otra forma de realización más, cada dosis comprenderá de 1 - 5 µg.

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

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

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

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

45 Se apreciará que ciertos componentes, por ejemplo los componentes de DTPw, pueden combinarse por separado antes de añadir el componente de AgHBs adsorbido u otros componentes.

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

antígenos Hib, Vi, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB y/o HepA se añaden antes de ajustar el pH. En una forma de realización, se adsorbe uno o más antígenos de la invención sobre fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio o una mezcla de ambos. En otra forma de realización, los antígenos de la invención se mezclan con un excipiente y/o adyuvante(s) farmacéuticamente aceptables.

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

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

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

En una forma de realización, las vacunas se preparan a una temperatura entre 15 °C y 30 °C (por ejemplo, entre 19 °C y 27 °C, o a 23 ± 4 °C).

Administración de las vacunas divulgadas

En el presente documento se divulga un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una vacuna divulgada en el presente documento. Las vacunas pueden ser administradas de manera profiláctica (es decir, para prevenir la infección). Preferentemente, la respuesta inmunitaria es protectora y, preferentemente, implica la aparición de anticuerpos. El procedimiento puede provocar una respuesta de refuerzo.

Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo (posteriores) espaciadas adecuadamente. La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. A un programa de dosis principal, que puede ser en el primer año de vida, le puede seguir un programa de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis iniciales (p. ej., entre 4-16 semanas) y entre la administración inicial y la de refuerzo se pueden determinar de forma rutinaria.

En una forma de realización, el mamífero es un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es, preferentemente, un niño (p. ej., un niño pequeño o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es, preferentemente, un adulto. Una vacuna destinada a niños puede también administrarse a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad etc.

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

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

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

Las vacunas divulgadas se pueden usar para obtener inmunidad sistémica y/o de las mucosas.

5 Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección bacteriana tras la administración de la composición divulgada. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias contra los antígenos básicos tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones puede determinarse por medio de la administración de las mismas a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12 a 16 meses de edad, o a modelos animales, documento WO 01/30390) y la posterior determinación de parámetros inmunológicos convencionales. Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán alrededor de varios meses después de la administración de la composición y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. En lugar de evaluar la eficacia de protección real en los pacientes, son muy conocidos los modelos animales estándar y los modelos in vitro, así como las correlaciones de protección útiles para evaluar la eficacia de las vacunas DTP.

10 Los inventores pretenden que los términos “que comprende”, “comprende” y “consiste”, puedan opcionalmente sustituirse con las expresiones que “consiste en”, “consiste en” “constituido por”, respectivamente, en cada caso. . Esto no cambia el significado normal de estos términos y sólo pretende proporcionar una base para la sustitución, no para que su significado sea equivalente.

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Pruebas en formulaciones de IPV de dosis bajas

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

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

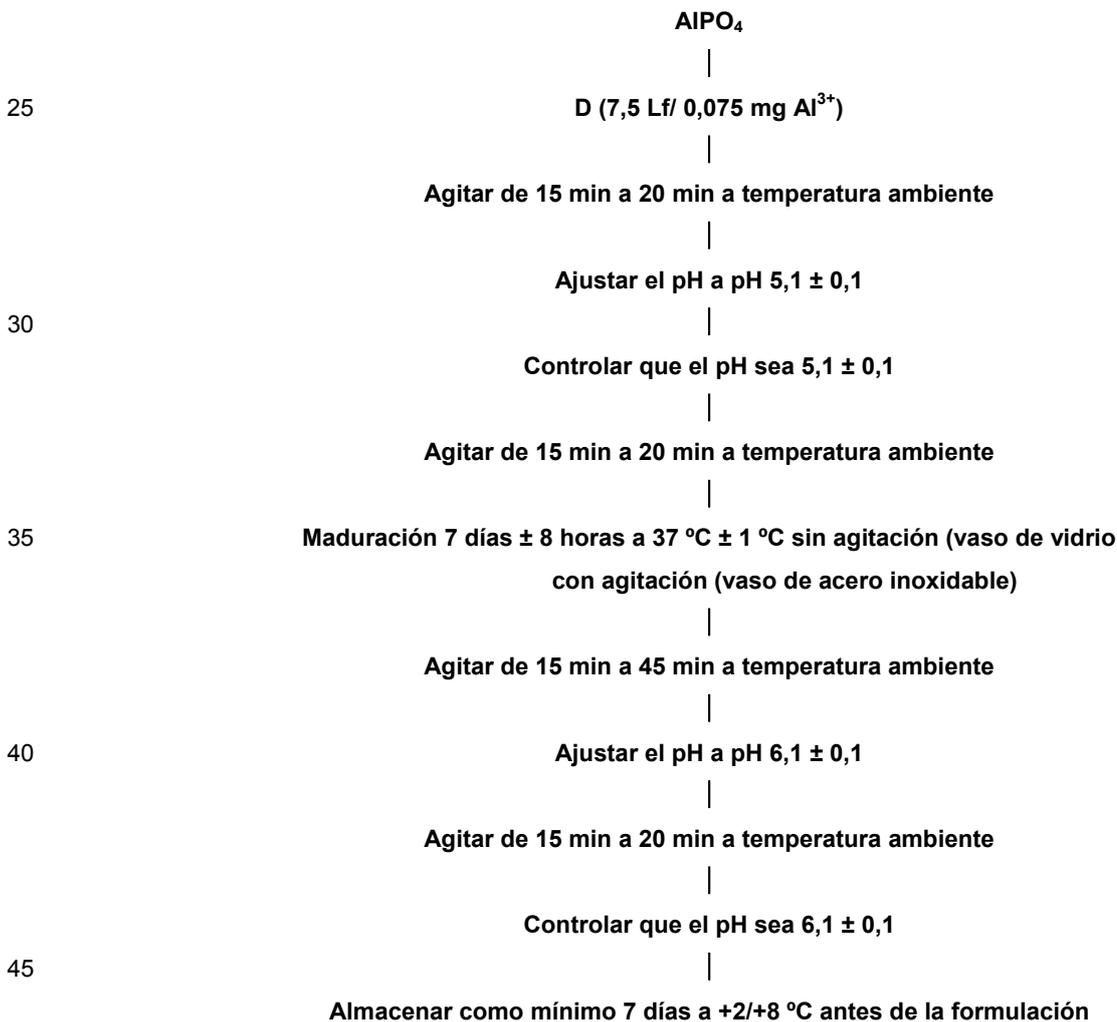


Tabla 1. Procedimiento de producción para la adsorción del toxoide diftérico

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

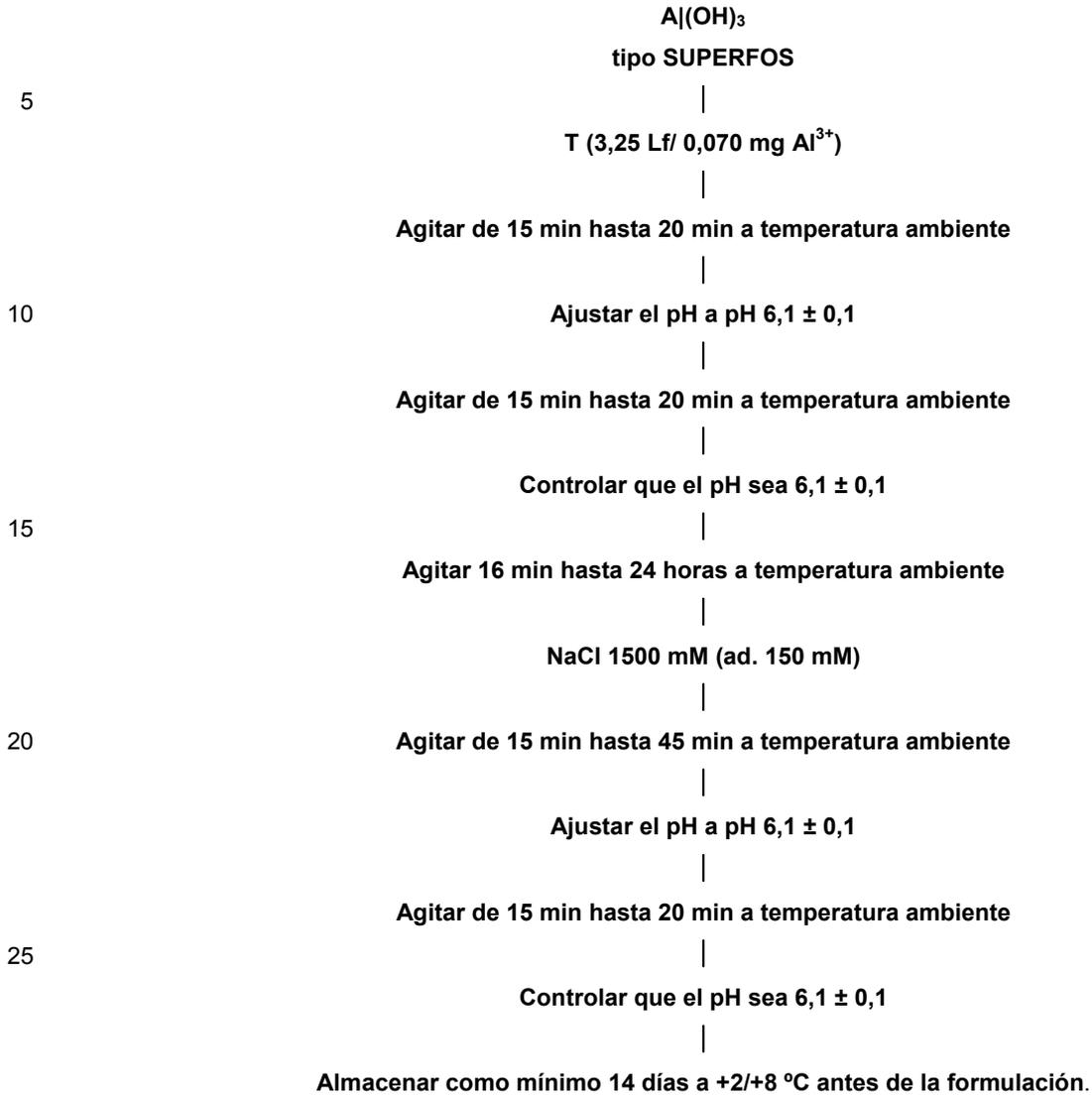
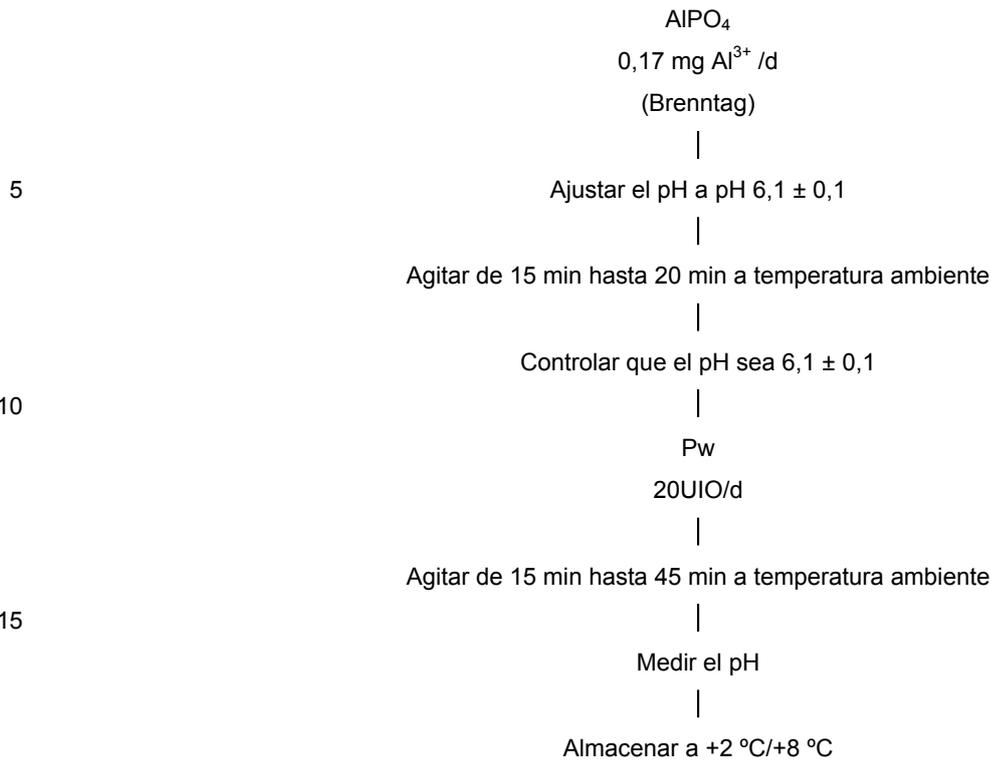


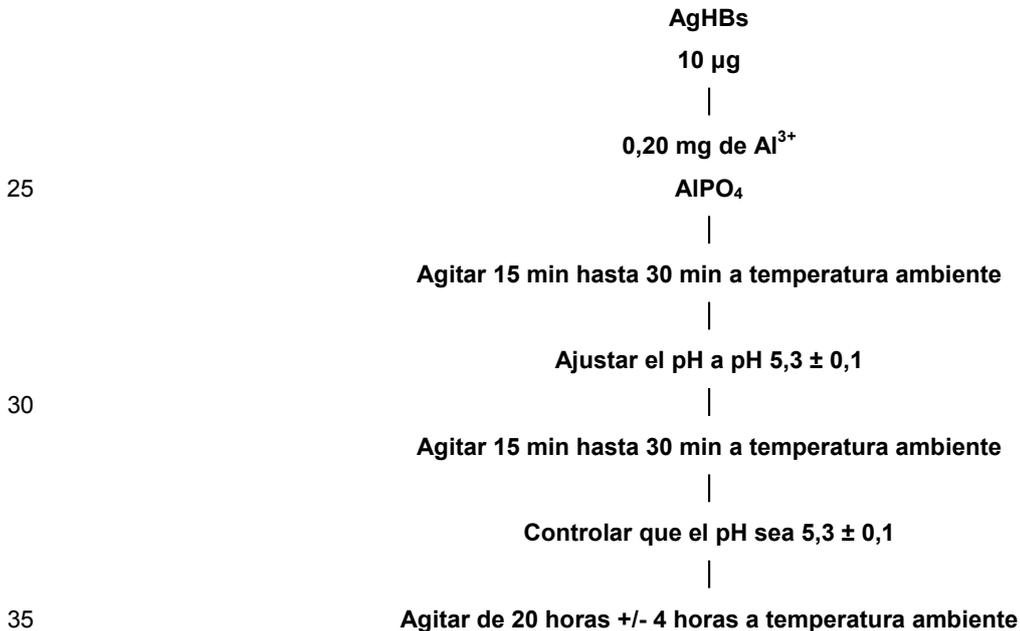
Tabla 2. Procedimiento de producción para la adsorción del toxoide tetánico

COMPOSICIÓN FINAL por dosis	
Tétanos	3,25 Lf (+/-360 Lf/ml)
Al ³⁺	0,070 mg
NaCl	150 mM
pH	6,1 +/- 0,1
Volumen	aproximadamente 9 µl



20 **Tabla 3. Procedimiento de producción para adsorción de Pw**

COMPOSICIÓN FINAL por dosis			
Antígenos		Adyuvante	[Al³⁺](mg)
Pw	20 UIO	AIPO ₄	0,170 mg
Al ³⁺	0,170 mg	AIPO ₄	
NaCl	150 mM		
pH	6,8		
Volumen	aproximadamente 65 µl		



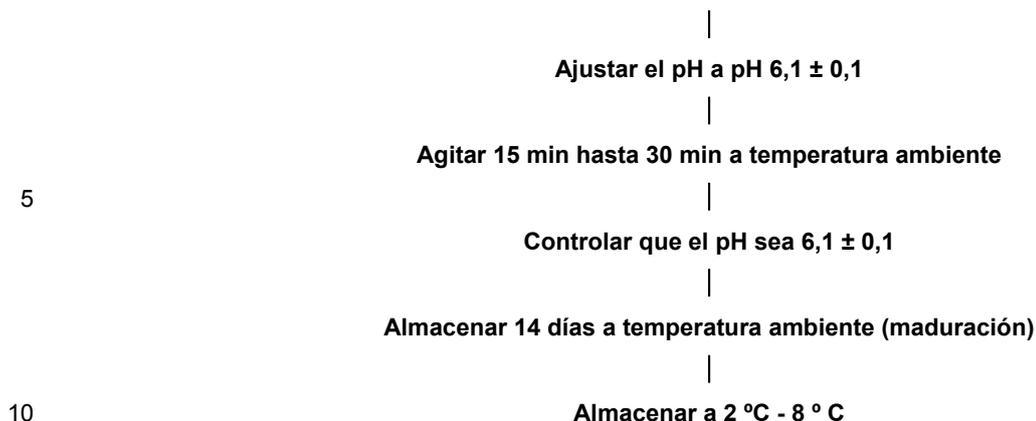


Tabla 4. Procedimiento de producción para la adsorción de AgHBs

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

Se probaron varias formulaciones diferentes:

- 15 • Una combinación de toxoide diftérico, toxoide tetánico, células enteras de pertussis y antígeno de superficie de la hepatitis B: DTPW_{SF}-HB como referencia (DTPW_{SF} significa que es una formulación libre de tiomersal), formulada con el Método de producción 1 (tabla 5).
- Producto Poliorix® de Glaxo SmithKline Biologicals S.A. (IPV solo no adsorbido) como referencia no adsorbida en la dosis estándar, formulada con el Método de producción 2 (tabla 5).
- 20 • Una combinación de toxoide diftérico, toxoide tetánico, células enteras de pertussis y antígeno de superficie de la hepatitis B y virus de la polio inactivado: DTPW_{SF}-HB-IPV con adición del IPV antes de Pw, formulada con el Método de producción 3 (tabla 5).
- Una combinación de toxoide diftérico, toxoide tetánico, células enteras de pertussis y antígeno de superficie de la hepatitis B y virus de la polio inactivado: DTPW_{SF}-HB-IPV con adición del IPV inmediatamente después de la adsorción de T. Este procedimiento de adición permite la adsorción de IPV en Al(OH)₃. Esta vacuna está formulada con el Método de producción 4 (tabla 5).

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

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

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

Etapa		Método de producción 2: IPV solo															
1	Añadir IPV en un dosis de	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tipo 1</th> <th>Tipo 2</th> <th>Tipo 3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>40 UI</td> <td>8 UI</td> <td>32 UI</td> </tr> <tr> <td>20 UI</td> <td>4 UI</td> <td>16 UI</td> </tr> <tr> <td>10 UI</td> <td>2 UI</td> <td>8 UI</td> </tr> <tr> <td>5 UI</td> <td>1 UI</td> <td>4 UI</td> </tr> </tbody> </table>	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	40 UI	8 UI	32 UI	20 UI	4 UI	16 UI	10 UI	2 UI	8 UI	5 UI	1 UI	4 UI
Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3															
40 UI	8 UI	32 UI															
20 UI	4 UI	16 UI															
10 UI	2 UI	8 UI															
5 UI	1 UI	4 UI															
2	Añadir tampón M199 hasta alcanzar el volumen final de 0,5 ml																
9	Agitar																
10	Ajustar el pH a pH 6,9 ± 0,2																
14	Almacenar a + 2 hasta + 8 °C																

Etapa		Método de producción 3: DTP_{W_{SF}}- HB - IPV															
1	Agua para inyectables hasta alcanzar el volumen final de la dosis de 0,5 ml																
2	Añadir NaCl 1,5 M hasta alcanzar una concentración final de 150 mM																
3	Añadir 115 µg de Al ³⁺ como AlPO ₄																
4	Añadir 10 µg de AgHBs adsorbido																
5	Añadir 7,5 Lf de toxoide diftérico adsorbido																
6	Añadir 3,25 Lf de toxoide tetánico adsorbido																
7	Agitar																
8	Añadir IPV en un dosis de	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tipo 1</th> <th>Tipo 2</th> <th>Tipo 3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>40 UI</td> <td>8 UI</td> <td>32 UI</td> </tr> <tr> <td>20 UI</td> <td>4 UI</td> <td>16 UI</td> </tr> <tr> <td>10 UI</td> <td>2 UI</td> <td>8 UI</td> </tr> <tr> <td>5 UI</td> <td>1 UI</td> <td>4 UI</td> </tr> </tbody> </table>	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	40 UI	8 UI	32 UI	20 UI	4 UI	16 UI	10 UI	2 UI	8 UI	5 UI	1 UI	4 UI
Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3															
40 UI	8 UI	32 UI															
20 UI	4 UI	16 UI															
10 UI	2 UI	8 UI															
5 UI	1 UI	4 UI															
9	Agitar																
10	Ajustar el pH a pH 6,5 ± 0,1																
11	Agitar																
12	Añadir 20 UIO de Pw adsorbido																
13	Agitar																
14	Almacenar a + 2 hasta + 8 °C																

Etapa		Método de producción 4: DTP _{W_{SF}} - HB - IPV		
1	Agua para inyectables hasta alcanzar el volumen final de la dosis de 0,5 ml			
2	Añadir NaCl 1,5 M hasta alcanzar una concentración final de 150 mM			
3	Añadir 3,25 Lf de toxoide tetánico adsorbido			
4	Añadir IPV en un dosis de			
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	
	40 UI	8 UI	32 UI	
	20 UI	4 UI	16 UI	
	10 UI	2 UI	8 UI	
	5 UI	1 UI	4 UI	
5	Agitar			
6	Añadir 115 µg de Al ³⁺ como AlPO ₄			
7	Añadir 10 µg de AgHBs adsorbido			
8	Añadir 7,5 Lf de toxoide diftérico adsorbido			
9	Agitar			
10	Ajustar el pH a pH 6,5 ± 0,1			
11	Agitar			
12	Añadir 20 UIO de Pw adsorbido			
13	Agitar			
14	Almacenar a + 2 hasta + 8 °C			
Método de producción 5: placebo				
Como en el Método de producción 3, aunque se han omitido todos los antígenos distintos de IPV				

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

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

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

15 Para el Método de producción de la formulación 4, el antígeno T se adsorbió en Al(OH)₃. El antígeno T preadsorbido se añadió a una suspensión que contenía agua y NaCl, seguido de IPV tipos 1, 2 y 3. La mezcla se agitó durante 60-75 minutos antes de la adición del AlPO₄ libre. Se añadió AgHBs preadsorbido, seguido del antígeno D preadsorbido, y la mezcla se agitó durante otros 60-75 minutos. El pH se ajustó a 6,5 antes de la adición de los antígenos Pw.

En última instancia se seleccionó el Método de producción 3 debido a la facilidad de fabricación ya que este protocolo sólo incluyó una etapa de agitación. Durante el proceso de fabricación de la vacuna, no se usa tiomersal y no se añade al producto final de la vacuna.

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

Descripción	Al ³⁺ como AlPO ₄ para adsorción de D	Al ³⁺ como Al(OH) ₃ para adsorción de D	Al ³⁺ como AlPO ₄ para adsorción de AgHBs	Al ³⁺ como AlPO ₄ para adsorción de Pw	AIP O ₄ libre	Al(OH) ₃ libre	Dosis del toxoide diftérico:	Dosis del toxoide tetánico	Dosis de pertusis	Dosis de AgHBs	Dosis de IPV	
											% de dosis estándar	Unidades de antígeno D (*) (T1/T2/T3)
Método de producción 1 DTPwSF-HB	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7,5Lf	3,25Lf	20 UIO	10 µg	NA	NA
Método de producción 2 de IPV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de producción 3 de DTPwSF-HB	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7,5Lf	3,25Lf	20 UIO	10 µg	100 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Procedimiento de producción 4 de DTPwSF-HB	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7,5Lf	3,25Lf	20 UIO	10 µg	100 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de producción 5 de Placebo	NA	NA	NA	NA	560 µg	70 µg	NA	NA	NA	NA	100 %	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4

(*) El contenido del antígeno D es el valor buscado para la dilución de la carga de pollo inactivado concentrado durante la formulación. **Tabla 6. Composición de las formulaciones por dosis de 0,5 ml.**

Determinación de la potencia de polio en ratas por seroneutralización

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

5

10 Prueba de seroneutralización:

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

15

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

20

En cada grupo, se registraron los animales con anticuerpos neutralizantes y se determinaron los títulos de anticuerpos de cada muestra de suero para los diferentes tipos de poliovirus. El valor de anticuerpos neutralizantes se expresó como el log2 de la inversa de la mayor dilución de la muestra de suero que inhibía totalmente el efecto citopático del virus de la polio en células Hep-2. También se determinó la media geométrica del valor (MGV) por dilución y por tipo de virus para cada grupo de ratas.

25

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

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

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

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

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

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

Etapas de desorción

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

45

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

50 Cuantificación del antígeno D mediante ELISA:

Se recubrieron placas de microtitulación con IgG específica anti-virus de la polio (tipos 1, 2 o 3) de conejo, diluida

5 con tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después del lavado, se añadió la disolución de saturación (disolución salina tamponada con fosfato sin Ca y Mg + BSA al 1 %). Se añadieron por 26 duplicado blancos (PBS) y diluciones en serie de muestras de vacunas y patrones internos no adsorbidos. La preparación del patrón interno trivalente contiene antígenos tipo 1, 2 y 3 calibrados. El calibrador es la referencia biológica de la farmacopea europea (EPBRP).

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

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

15 Como complemento de la potencia mediante ELISA, cualquier antígeno IPV no adsorbido puede detectarse mediante el procedimiento de finalización:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS

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

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

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

Descripción	Potencia del IPV (DE50 expresada en UI/dosis)		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Ref. Poliorix	20,78	8,88	40,02
Ref. DTPaHBIPV	3,21	0,57	8,62
Procedimiento de producción 3 de DTP _{WSF} -HB-IPV	<1,93	0,64	<2,57

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

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

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

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

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

Tabla 9

15

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)
Referencia DTPaIPVHB	82 %	NP	99 %	NP	93 %	NP
“Método de producción 3” de DTP _{WSF} -HB-IPV con 100 % de IPV	46 %	47 %	94 %	<5 %	24 %	74 %
“Método de producción 3” de DTP _{WSF} -HB-IPV 2 con 100 % de IPV	80 %	<5 %	100 %	<5,0 %	81 %	17 %

ES 2 387 582 T3

(continuación)

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)
“Método de producción 3” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV 1 con 50 % de IPV	48 %	31 %	98 %	<5 %	29 %	64 %
“Método de producción 3” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV 2 con 50 % de IPV	71 %	<5 %	99 %	<5 %	91 %	>5 %
“Método de producción 3” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV 1 con 25 % de IPV	54 %	34 %	115 %	<5 %	33 %	71 %
“Método de producción 3” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV 2 con 25 % de IPV	81 %	<5 %	115 %	<5 %	107 %	<5 %
“Método de producción 3” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV con 12,5 % de IPV	50 %	24 %	110 %	<5 %	28 %	60 %
“Método de producción 4” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV con 100 % de IPV	41 %	48 %	93 %	<5 %	23 %	51 %
“Método de producción 4” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV con 50 % de IPV	47 %	37 %	98 %	<5 %	28 %	69 %
“Método de producción 4” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV con 25 % de IPV	51 %	28 %	80 %	<5 %	33 %	61 %
“Método de producción 4” de DTP _{W_{SF}} -HB-IPV con 12,5 % de IPV	42 %	22 %	100 %	<5 %	40 %	58 %

ES 2 387 582 T3

Muestra	T1		T2		T3	
	<i>Potencia de la polio (% de recuperación)</i>	<i>Finalización (% de recuperación)</i>	<i>Potencia de la polio (% de recuperación)</i>	<i>Finalización (% de recuperación)</i>	<i>Potencia de la polio (% de recuperación)</i>	<i>Finalización (% de recuperación)</i>

(continuación)

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)	Potencia de la polio (% de recuperación)	Finalización (% de recuperación)
"Método de producción 5" de Placebo con 100 % de IPV	86 %	<5 %	98 %	<5 %	107 %	<5 %
"Método de producción 5" de Placebo con 50 % de IPV	94 %	<5 %	110 %	<5 %	111 %	<5 %
"Método de producción 5" de Placebo con 25 % de IPV	80 %	<5 %	100 %	<5 %	104 %	<5 %
"Método de producción 5" de Placebo con 12,5 % de IPV	72 %	<5 %	100 %	<5 %	98 %	<5 %

5 La Tabla 9 muestra que la realización completa de la adsorción es similar para todas las dosis de IPV. En el Tipo 1 y el Tipo 3 se produce una desorción muy fuerte (17 % - 74 %) mientras que el Tipo 2 permanece bien adsorbido. Los tres tipos están bien adsorbidos para la formulación de placebo para todas las dosis de IPV. La adsorción es similar a la de la vacuna de referencia DTPaIPVHB.

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

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

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

20 La Figura 2 muestra que la potencia de IPV es similar para la formulación del Método de producción 3 y para la formulación del Método de producción 4. También se muestra que existe una tendencia hacia una mejor potencia para el placebo que para DTPw_{SF}-HB-IPV.

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

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

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

Tabla 11. Procedimiento de producción para DTPwHB-IPV

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

5 Se observó el aspecto visual y, hasta una relación de 69/46, se obtiene una agregación aceptable. Las formulaciones se llevaron a cabo con el mismo Método de producción y un intervalo de dosis de IPV de entre el 0 y el 100 % de la dosis regular de IPV.

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

Tabla 12. Porcentaje de desorción de toxoide D en DTPwHB-IPV con intervalo de dosis de IPV

		RELACIÓN Al(OH)₃/AlPO₄					
		Dosis de IPV	0/115		23/92		46/69
			T0	7d37 °C	T0	7d37 °C	T0 7d37 °C
PW_{SF}	0 %	<1 %	25 %	<1 %	6 %	/	
	25 %	<1 %	29 %	<1 %	15 %	<1 %	5 %
	50 %	3 %	41 %	<1 %	26 %	<1 %	17 %
	100 %	4 %	49 %	<1 %	23 %	<1 %	11 %

10 **Tabla 13. Porcentaje de desorción de toxoide T en DTPwHB-IPV con intervalo de dosis de IPV**

		RELACIÓN Al(OH)₃/AlPO₄					
		Dosis de IPV	0/115		23/92		46/69
			T0	7d37 °C	T0	7d37 °C	T0 7d37 °C
PW_{SF}	0 %	<1 %	34 %	<1	12 %	/	

(continuación)

		RELACIÓN Al(OH) ₃ /AlPO ₄					
		0/115		23/92		46/69	
		T0	7d37°C	T0	7d37°C	T0 7d37°C	
	25 %	<1 %	50 %	<1	32 %	<1 %	12 %
	50 %	5 %	61 %	<1	51 %	<1 %	33 %
	100 %	8 %	63 %	<1	41 %	<1 %	29 %

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

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

IPV		Estimación de Ag no adsorbido					
		RELACIÓN Al(OH) ₃ /AlPO ₄					
		0/115		23/92		46/69	
Dosis	Tipo	T0	21d 25°C	T0	21d 2 5°C	T0	21d 25°C
0 %	ND	ND	ND	ND	ND	AGREGACIÓN	
25 %	Tipo 1	~10-20 %	~20-30 %	~10-20 %	~20-30 %	<10 %	~20-30 %
	Tipo 2	<10 %	<10 %	<10 %	<10 %	<10 %	<10 %
	Tipo 3	>30 %	>30 %	~20-30 %	>30 %	<10 %	>30 %
50 %	Tipo 1	>30 %	>30 %	~10-20 %	>30 %	~10-20 %	>30 %
	Tipo 2	~10-20 %	~10-20 %	<10 %	<10 %	<10 %	<10 %
	Tipo 3	>30 %	>30 %	~10-20 %	>30 %	~10-20 %	>30 %
100 %	Tipo 1	>30 %	>30 %	~10-20 %	>30 %	~10-20 %	>30 %
	Tipo 2	~10-20 %	~10-20 %	<10 %	<10 %	<10 %	<10 %
	Tipo 3	>30 %	>30 %	~20-30 %	>30 %	~20-30 %	>30 %

El aumento del contenido de Al(OH)₃ en las formulaciones permitió una mejora en la adsorción para D, T e IPV.

La mejor relación de adsorción se obtuvo con la relación Al(OH)₃/AlPO₄ de 46/69.

A esta relación:

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

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

Tabla 15. Resultados de potencias in vivo

Muestra	DE50		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Relación DTPw-HB-IPV 100 %/HIB 46/69	<1,93	<0,64	2,57
Relación DTPw-HB-IPV 50 %/HIB 46/69	<1,59	0,46	<1,67
Relación DTPw-HB-IPV 25 %/HIB 46/69	3,08	0,96	3,25
Tetravac	8,53	0,39	9,15
Poliorix	9,52	2,64	15,06
DTPaHBIPV	<5,18	<0,64	15,01

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

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

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

10 • **Indicación/poblaciones:**

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

Grupos de estudio:

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

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

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

Vacunas DTPw-HBV/Hib + IPV

• **Objetivos coprimarios:**

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

25 ✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna DTPw-HBV-IPV (dosis estándar) / Hib a la vacuna IPV que se administra conjuntamente con la vacuna DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta de anticuerpos a los tres tipos de poliovirus, un mes después del ciclo de vacunación principal. Se alcanzará el objetivo de no inferioridad si el límite superior del IC del 95 % asintótico estandarizado sobre la diferencia entre los grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (dosis estándar) / Hib) en términos de tasas de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es < 10 %.

30 ✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna DTPw-HBV-IPV (49 % de la dosis estándar) / Hib a la vacuna IPV que se administra conjuntamente con la vacuna DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta de anticuerpos a los tres tipos de poliovirus, un mes después del ciclo de vacunación principal. Se alcanzará el objetivo de no inferioridad si el límite superior del IC del 95 % asintótico estandarizado sobre la diferencia entre los grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (49 % de la dosis estándar) / Hib) en términos de tasas de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es ≤ 10 %.

35 ✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna DTPw-HBV-IPV (26 % de la dosis estándar) / Hib a la vacuna IPV que se administra conjuntamente con la vacuna DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta de anticuerpos a los tres tipos de poliovirus, un mes después del ciclo de vacunación principal. Se alcanzará el objetivo de no inferioridad si el límite superior del IC del 95 % asintótico estandarizado sobre la diferencia entre los grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (26 % de la dosis estándar) / Hib) en términos de tasas de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es ≤ 10 %.

• **Objetivos secundarios:**

Inmunogenicidad

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

Reactogenicidad

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

• **Programa de vacunación**

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

10 • **País:**

Filipinas

• **Extracción de muestras de sangre:**

Antes y después de la vacunación 3

• **Formulaciones de vacunas:**

15

Tabla 16. Formulaciones de vacunas

Vacuna	Formulación/dosis	Presentación	Volumen
DTPw-HBV/Hib de GSK Biologicals Componente IPV 1 (dosis estándar) Componente IPV (49 % de la dosis estándar) Componente IPV (26 % de la dosis estándar)	Toxoide diftérico: No menos de 30 UI (7,5 Lf) Toxoide tetánico: No menos de 60 UI (3,25 Lf) <i>Bordetella pertussis</i> , muerta: No menos de 4 UI (20 UO) ADN-r AgHBs: 10 µg Aluminio como sales: 0,66 mg Poliovirus tipo 1 inactivado: 40 Unidades de antígeno D Poliovirus tipo 2 inactivado: 8 Unidades de antígeno D Poliovirus tipo 3 inactivado: 32 Unidades de antígeno D 49 % de la dosis estándar total de IPV (40-8-32) 26 % de la dosis estándar total de IPV (40-8-32)	Líquido blancuzco en viales monodosis	0,5 ml de la vacuna reconstituida
	Conjugado de polisacárido capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> de tipo b 2,5 ug y toxoide tetánico: 5-10 µg Lactosa: 12,6 mg Aluminio como sales: 30 µg	Pellas liofilizadas en viales monodosis	
DTPw-HBV/Hib de GSK Biologicals (Zilbrix™ Hib)	Toxoide diftérico: No menos de 30 UI (7,5 Lf) Toxoide tetánico: No menos de 60 UI (3,25 Lf) <i>Bordetella pertussis</i> , muerta: No menos de 4 UI (20 UO) ADN-r AgHBs: 10 µg Aluminio como sales: 0,66 mg Tiomersal: 8 µg	Líquido blancuzco en viales de dos dosis	1 ml de la vacuna reconstituida

(continuación)

Vacuna	Formulación/dosis	Presentación	Volumen
	Conjugado de polisacárido capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> de tipo b 2,5 µg y toxoide tetánico: 5-10 µg Lactosa: 12,6 mg Aluminio como sales: 30 µg	Pellas liofilizadas en viales de dos dosis	
IPV de GSK Biologicals (Poliorix)	Poliovirus tipo 1 inactivado: 40 Unidades de antígeno D Poliovirus tipo 2 inactivado: 8 Unidades de antígeno D Poliovirus tipo 3 inactivado: 32 Unidades de antígeno D 2-fenoxietanol max 2,5 mg Polisorbato max 50 µg Formaldehído max 100 µg Solución salina tamponada con fosfato Contiene aminoácidos para inyección, c.s., ad. 0,5 ml	Líquido blancuzco en viales monodosis	0,5 ml

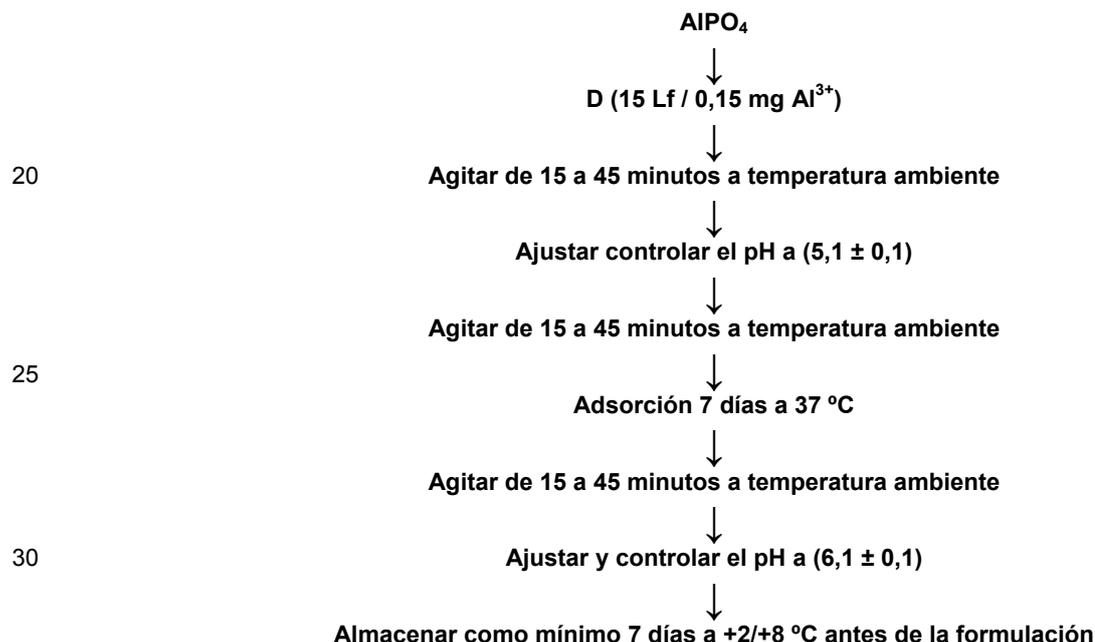
PREADSORCIÓN DE LOS ANTÍGENOS

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

Adsorción del toxoide diftérico

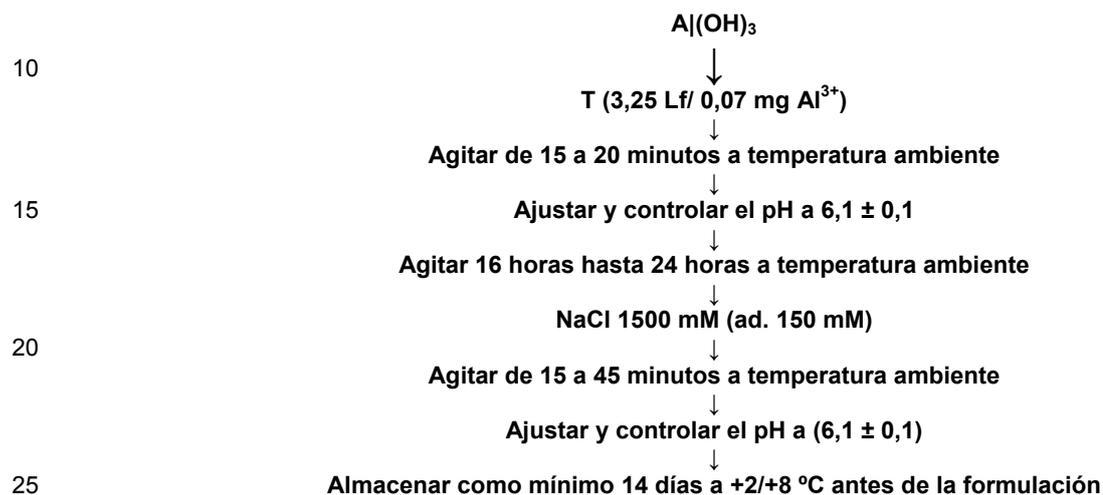
El concentrado purificado de difteria fue adsorbido sobre fosfato de aluminio en una proporción de 15 Lf de toxoide 10 diftérico / 0,15 mg de Al^{3+} . Los dos componentes se agitaron durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente. El pH se ajustó a un pH de $5,1 \pm 0,1$, seguido de agitación durante 15 hasta 45 minutos. La mezcla se almacenó durante una semana a 37 °C. Después de agitar de 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente, el pH se ajustó a un pH de $6,1 \pm 0,1$. El concentrado adsorbido se almacenó entre +2 °C y +8 °C durante al menos 7 días antes de la formulación final de la vacuna DTPw-HB-IPV. . La Figura 1 a continuación pone de relieve el proceso de adsorción de la fabricación del toxoide diftérico preadsorbido a granel.

Diagrama de flujo de la adsorción del toxoide diftérico

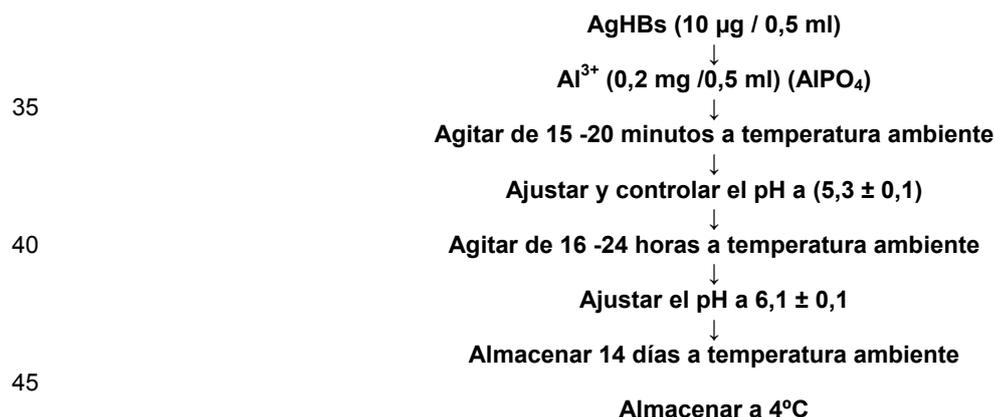


Adsorción del toxoide tetánico

El concentrado purificado de toxoide tetánico se adsorbió sobre hidróxido de aluminio en una proporción de 3,25 Lf / 0,07 mg de Al^{3+} . Los dos componentes se agitaron durante 15 hasta 20 minutos. El pH se ajustó a un pH de $6,1 \pm 0,1$. La mezcla se almacenó con agitación durante 16 hasta 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió una disolución de cloruro de sodio de concentración nominal 1.500 mM (ad 150 mM). Después de agitar de 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente, el pH se ajustó a un pH de $6,1 \pm 0,1$. El concentrado adsorbido se almacenó entre $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 14 días antes de la formulación final de la vacuna DTPw-HB-IPV.

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

El AgHBs purificado a granel estéril se mezcló con una suspensión estéril de fosfato de aluminio con el fin de obtener una suspensión que contenía por cada 10 μg de AgHBs, 0,2 mg de Al^{3+} (como fosfato de aluminio), NaCl 150 mM en un volumen final de aproximadamente 50 μl .

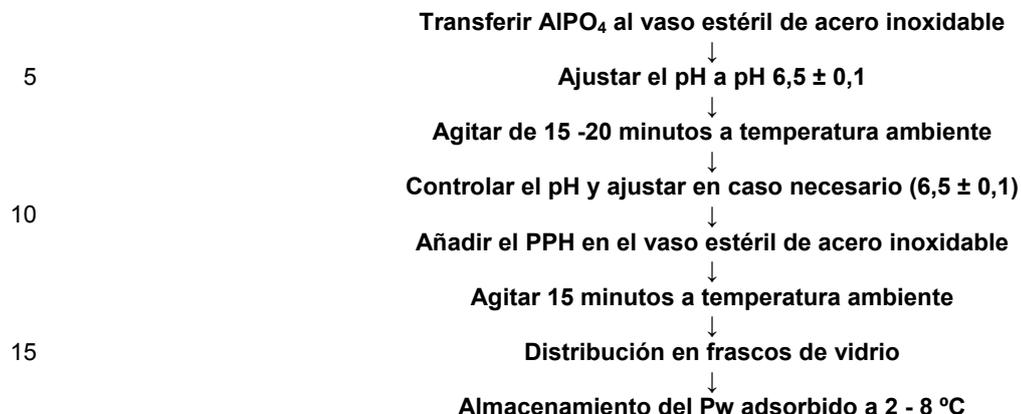
Procedimiento de adsorción de AgHBs**Adsorción del antígeno Pw**

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

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

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

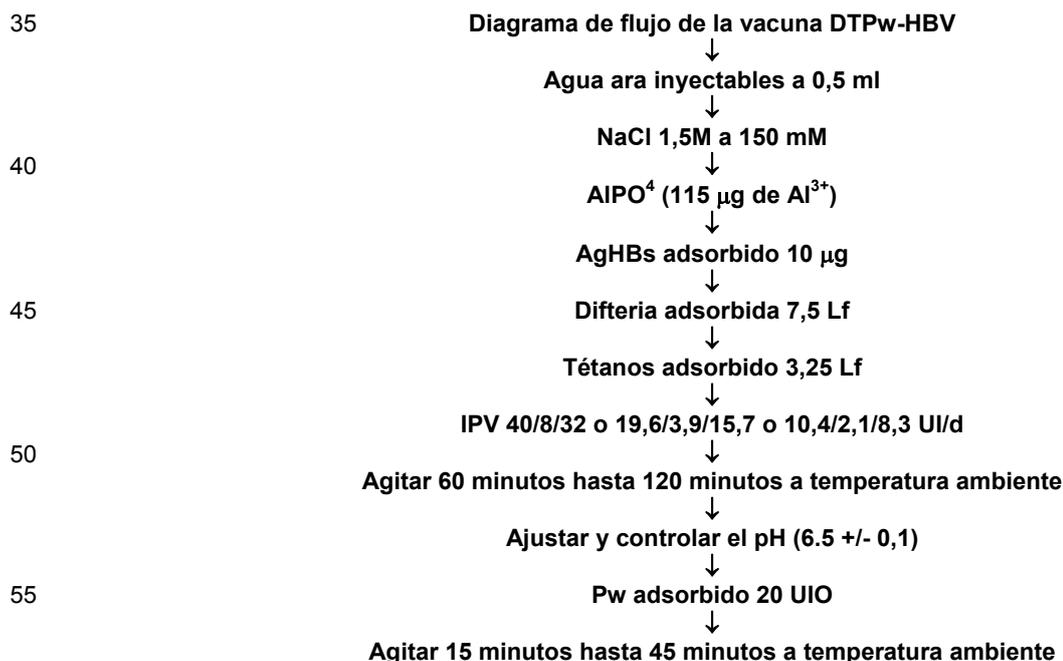
Diagrama de flujo de la adsorción de Pw



FORMULACIÓN FINAL DE DTPW-VHB-IPV

20 El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se mezcló la solución de cloruro de sodio y el agua para inyecciones para alcanzar una concentración final de NaCl 150 mM.
- Se añadió AlPO₄ para obtener una concentración de Al³⁺ libre de 0,115 mg/dosis.
- Se añadieron los concentrados de HEF, difteria y tétanos adsorbidos para obtener una concentración final de 10 µg de AgHBs, toxoide diftérico 7,5 Lf y toxoide tetánico 3,25 Lf por dosis de 0,5 ml.
- Se añadió IPV para obtener una concentración final de 40/8/32 o 19,6/3,9/15,7 o 10,4/2,1/8,3 UI/d.
- Se agitó suavemente durante 60 hasta 120 minutos a temperatura ambiente
- Se ajustó el pH a 6,5 ± 0,1
- Se agitó durante 15 hasta 20 minutos a temperatura ambiente
- Se controló el pH: 6,5 +/- 0,1
- Se añadió el concentrado de Pw adsorbido para obtener una concentración final de 20 UIO por dosis de 0,5 ml.
- Se agitó durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente.
- Se midió el pH
- El producto final a granel se almacenó entre +2 °C y 8 °C hasta rellenar.



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

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

• **Indicación/poblaciones:**

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

10 • **Grupos de estudio:**

Vacuna DTPa-HBV-IPV (49 % de la dosis estándar) / Hib 5 µg

Vacuna DTPa-HBV-IPV (49 % de la dosis estándar) / Hib 2,5 µg

Vacuna DTPa-HBV-IPV (26 % de la dosis estándar) / Hib 5 µg

Vacuna DTPa-HBV-IPV (26 % de la dosis estándar) / Hib 2,5 µg

15 Vacuna DTPa-HBV-IPV/Hib

Vacunas DTPw-HBV/Hib + IPV

• **Objetivos principales:**

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

20 • **Objetivos secundarios: Inmunogenicidad**

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

Reactogenicidad

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

• **Programa de vacunación**

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

• **País:**

30 TBC

• **Extracción de muestras de sangre:**

Antes y después de la vacunación 3

• **Formulaciones de vacunas:**

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

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

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

Componente	Cantidad
Toxoide D:	25 Lf

ES 2 387 582 T3

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para fabricar una vacuna de combinación que comprende poliovirus de tipo 1 inactivado para inmunizar un huésped humano, que comprende las etapas de: Mezclar el toxoide diftérico y el toxoide tetánico, seguido de la adición de poliovirus inactivado de tipo 1 a una dosis superior a 10 unidades de antígeno D y menos de 20 unidades de antígeno D.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la vacuna comprende poliovirus inactivado de tipo 1 a 26 - 49 %, 30 - 45 %, 33 - 40 % o 35 - 37 % de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la vacuna comprende adicionalmente poliovirus de tipo 3 inactivado a una dosis de 8-20 unidades de antígeno D, 9-19 unidades de antígeno D, 10-18 unidades de antígeno D, 11-17 unidades de antígeno D, 12-16 unidades de antígeno D o 13-15 unidades de antígeno D.
4. El procedimiento de las reivindicaciones 1-3, en el que la vacuna comprende adicionalmente poliovirus inactivado de tipo 2 a una dosis de 2-4 unidades de antígeno D.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 1-4, que comprende la etapa siguiente de ajustar el pH a $6,5 \pm 0,5$, o pH 5.9 - 7.2, o pH 6 - 7, o pH 6,2 - 6,8 o pH 6,4 - 6,6.
- 15 6. El procedimiento de las reivindicaciones 1-5, que comprende las etapas posteriores de añadir un(os) componente(s) de pertussis acelulares o de células enteras muertas y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el fosfato de aluminio libre está presente antes de la adición de los antígenos.
- 20 8. El procedimiento de las reivindicaciones 1-7, que comprende la etapa adicional de añadir antígeno de superficie de la hepatitis B antes de ajustar el pH o antes de la adición de IPV.
- 25 9. El procedimiento de las reivindicaciones 1-7, que comprende la etapa adicional de mezclar uno o más antígenos de un patógeno seleccionado de una lista constituida por: *Haemophilus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria Meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi* y Hepatitis A, con toxoide diftérico, toxoide tetánico y poliovirus inactivados de los tipos 1, 2 y/o 3 antes de ajustar el pH, o el procedimiento de la reivindicación 8, que comprende la etapa adicional de mezclar uno o más antígenos de un patógeno seleccionado de una lista constituida por: *Haemophilus infl uenzae* b, *Neisseria Meningitidis* tipo A, *Neisseria Me ningitidis* tipo C, *Neisseria men ingitidis* tipo W, *Neisseria men ingitidis* tipo Y, *Neisseria me ningitidis* tipo B, *Salmonella t yphi* y Hepatitis A, con toxoide diftérico, toxoide tetánico, poliovirus inactivados de los tipos 1, 2 y/o 3 y antígeno de superficie de la Hepatitis B antes de ajustar el pH.
- 30 10. El procedimiento de las reivindicaciones 1-9, en el que la vacuna comprende IPV de tipos 1, 2 y 3 adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, o una mezcla de ambos, en el que la adsorción tiene lugar antes de mezclar con un antígeno distinto al IPV o en el que adsorción tiene lugar después de mezclar con un antígeno distinto al IPV.
- 35 11. El procedimiento de las reivindicaciones 1-10, en el que la vacuna comprende un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib).
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho conjugado se adsorbe sobre fosfato de aluminio o no se adsorbe sobre un adyuvante y en el que la adsorción tiene lugar antes o después de mezclar con otros antígenos.
- 40 13. El procedimiento de las reivindicaciones 1-12, en el que la vacuna comprende uno o más de: células enteras muertas de *Bordetella pertussis* (Pw); dos o más componentes de pertussis acelulares (Pa); uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de una bacteria seleccionada del grupo de *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria Meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W y *Neisseria meningitidis* tipo Y; una vesícula de la membrana externa de *Neisseria me ningitidis* tipo B (MenB) o LOS o un sacárido capsular conjugado MenB, o derivado de los mismos; un sacárido Vi de *Salmonella typhi* conjugado a una proteína portadora; o un antígeno de la Hepatitis A.
- 45 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la vacuna comprende toxoide diftérico y/o toxoide tetánico adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, o una mezcla de ambos, en el que la adsorción tiene lugar antes o después de mezclar con otros antígenos.
15. El procedimiento de las reivindicaciones 1-14, en el que el contenido total de aluminio en la vacuna es de 200 - 1000 µg, 300 - 900 µg, 400 - 800 µg, 500 - 700 µg o de alrededor de o exactamente 630 µg Al³⁺ por dosis de 0,5 ml.
- 50 16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el IPV de tipo 1, si está presente en la vacuna, es la cepa Mahoney; y/o en el que el IPV de tipo 2, si está presente en la vacuna, es la cepa MEF-1; y/o en

el que el IPV de tipo 3, si está presente en la vacuna, es la cepa Saukett.

FIGURA 1

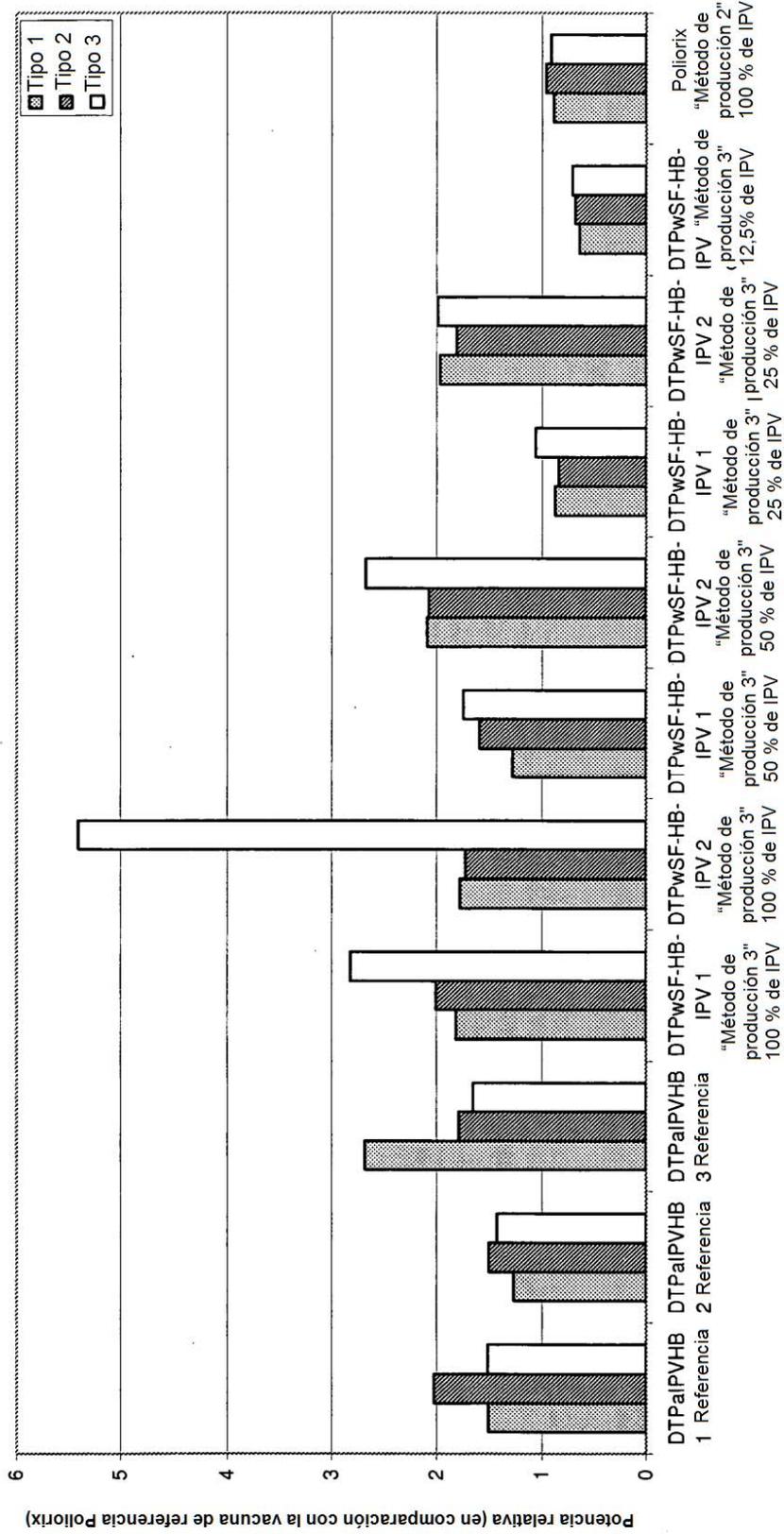


FIGURA 2

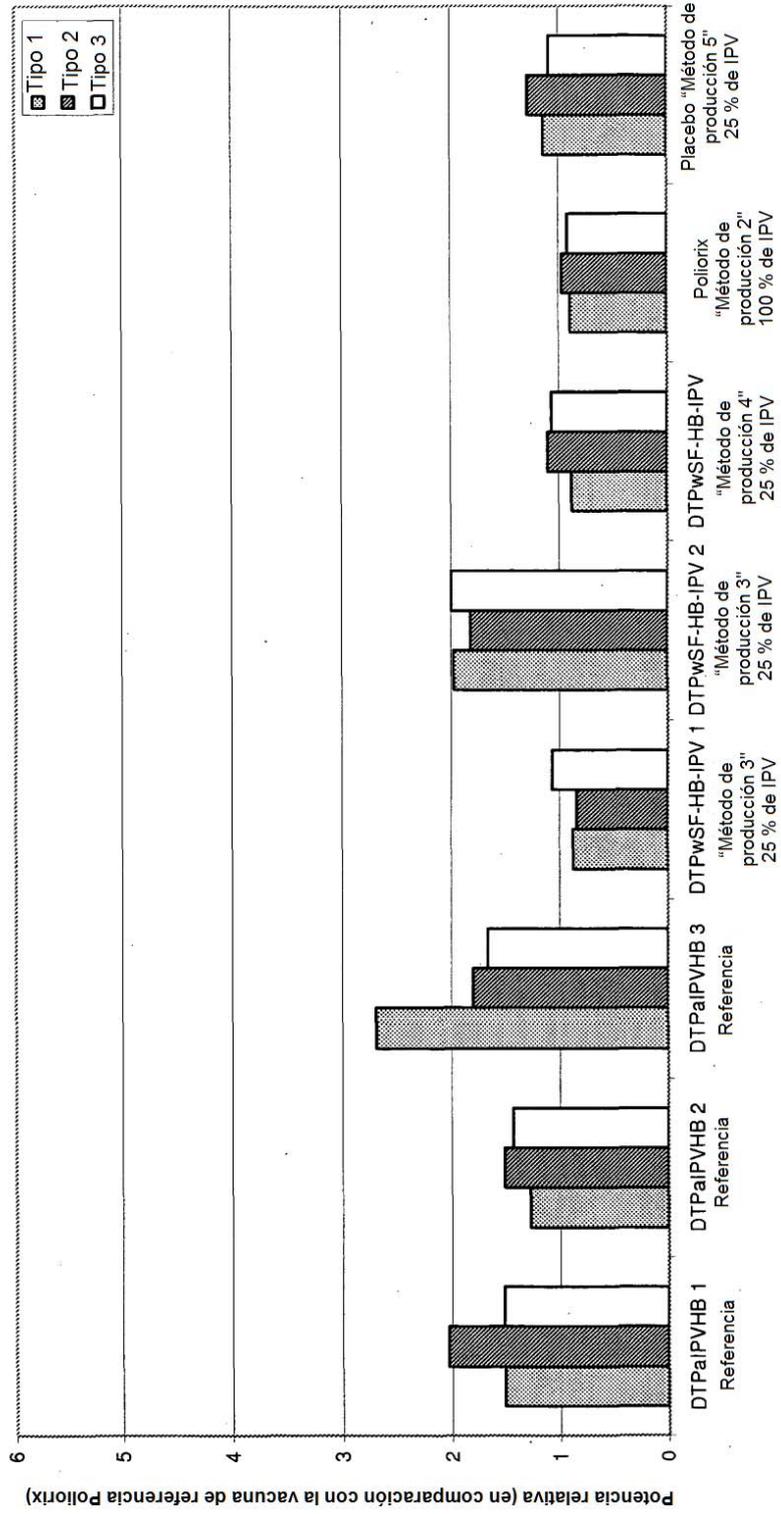
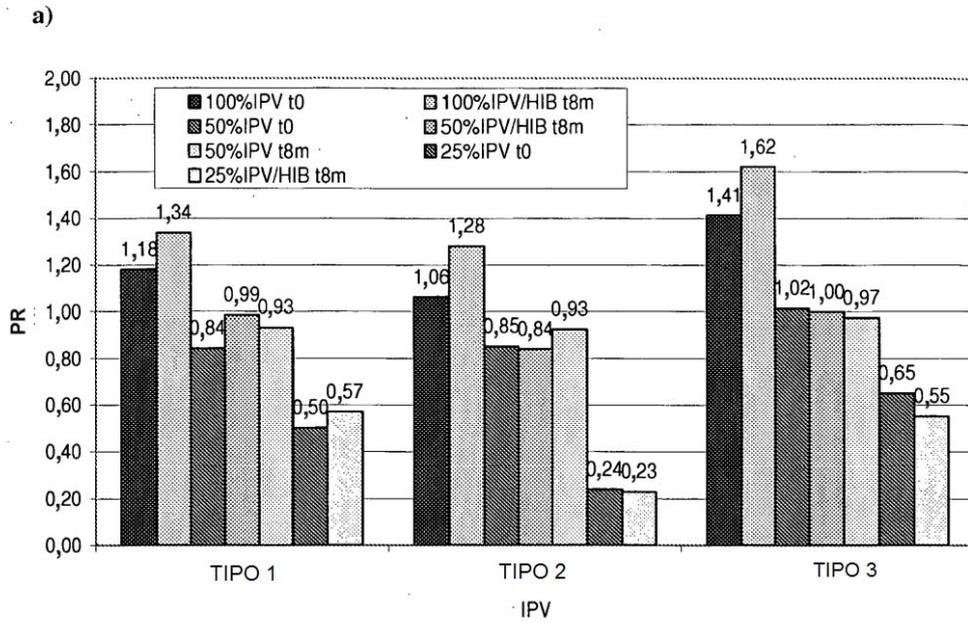


FIGURA 3



b)

FIGURA 3

