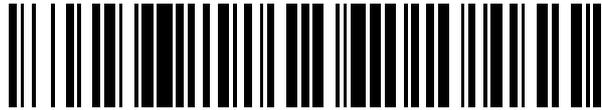


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 529**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/13** (2006.01)

**A61K 39/29** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 08075547 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1967204**

54 Título: **Vacunación múltiple incluyendo meningococo del serogrupo C**

30 Prioridad:

**01.09.2005 US 713801 P**

**16.12.2005 US 750894 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.02.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS GMBH  
(100.0%)  
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76  
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**BORKOWSKI, ASTRID**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 443 529 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Vacunación múltiple incluyendo meningococo del serogrupo C

### 5 CAMPO TECNICO

Está invención está en el campo de inmunizar pacientes contra patógenos múltiples.

### 10 ANTECEDENTES DE LA TECNICA

15 Las vacunas que contienen antígenos de más de un organismo patogénico dentro de una única dosis se conocen como vacunas "multivalentes" o "combinadas". Se han aprobado varias vacunas combinadas para uso humano en la UE y en USA, incluyendo vacunas trivalentes para proteger contra la difteria, el tétano y la tosferina (vacunas "DTP") y vacunas trivalentes para proteger contra el sarampión, las paperas y la rubeola (vacunas "MMR").

20 Las vacunas combinadas ofrecen a los pacientes la ventaja de recibir un número reducido de inyecciones, que lleva a la ventaja clínica de cumplimiento aumentado (por ejemplo ver capítulo 29 de la referencia 1), particularmente para la vacunación pediátrica. Al mismo tiempo, sin embargo, presentan dificultades de fabricación debido a factores que incluyen: incompatibilidad física y bioquímica entre los antígenos y otros componentes; interferencia inmunológica; y estabilidad. Varias vacunas combinadas se divulgan en las referencias 2 a 10.

25 En el 2005, un estudio ampliamente divulgado [11] informó que la inmunogenicidad de la vacuna conjugada sacárida capsular del serogrupo C ('MenC') de la *N.meningitidis* era disminuida cuando se administraba con un sacárido conjugado de *S.pneumoniae* 9-valente como una vacuna combinada. Además, se vieron respuestas disminuidas a tanto el conjugado tipo b ('Hib') de la *H.influenzae* co-administrada como al toxoide de la difteria co-administrado. Los autores concluyeron que la vacuna combinada 'Pnc9-MenC' "puede no ser un reemplazo adecuado para las vacunas glicoconjugadas de MenC o neumocócica individuales". Además, sugirieron que la incompatibilidad podía no estar ligada a la naturaleza combinada de los antígenos, y que es "posible que la administración de las vacunas de forma separada pueda tener el mismo efecto".

30 Por lo tanto sigue habiendo una necesidad para una inmunización que pueda proteger contra el MenC y el neumococo sin pérdida significativa de la inmunogenicidad de estos dos componentes. Hay una necesidad adicional para una inmunización que pueda proteger contra el MenC, el neumococo, difteria y Hib sin pérdida significativa de la inmunogenicidad de estos cuatro componentes. De forma más general, sigue habiendo una necesidad para integrar la inmunización contra el MenC en los programas de inmunización existentes.

### 35 RESUMEN DE LA INVENCION

40 La invención proporciona un kit para el uso en un método de desarrollar una respuesta inmune en un paciente, en donde el kit comprende un primer componente inmunogénico, un segundo componente inmunogénico y un tercer componente para la administración en sitios diferentes en sustancialmente el mismo tiempo. El primer componente inmunogénico comprende una formulación acuosa de sacáridos capsulares conjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23 F de la *S.pneumoniae* y un adyuvante de fosfato de aluminio. El segundo componente inmunogénico comprende un sacárido capsular conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*. Al menos uno de los conjugados neumocócicos tiene la misma proteína portadora que el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*, dicha proteína portadora es una toxina bacteriana en forma toxoide, y los conjugados neumocócicos están preparados para ser administrados de forma separada del conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis* a un paciente. El tercer componente comprende un antígeno de poliovirus inactivado; un toxoide de difteria; un toxoide de tétano; un antígeno de *B.pertussis* acelular; y un antígeno de superficie de la hepatitis B. El kit incluye además un antígeno del Hib conjugado.

50 la invención se refiere además a (a) una formulación acuosa de sacáridos capsulares conjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de la *S.pneumoniae*, que comprende un adyuvante de fosfato de aluminio; (b) un sacárido capsular conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*; en donde al menos uno de los conjugados neumocócicos tiene la misma proteína portadora que el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*, dicha proteína portadora es una toxina bacteriana en forma toxoide; y (c) una composición que comprende un antígeno de poliovirus inactivado (IPV); y un toxoide de difteria (D); un toxoide de tétano (T); un antígeno de *B.pertussis* acelular (Pa); y un antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) para su uso en un método de inmunizar un paciente, en donde los conjugados neumocócicos, el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis* y la composición DTPa-IPV-HBsAg son para la administración separada a un paciente sustancialmente en el mismo tiempo.

### 60 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

65 Mientras que el estudio de la referencia 11 encontró una reducción en la inmunogenicidad del MenC, esta reducción no se ve con la presente invención. En comparación con el estudio de la referencia 11, la invención difiere

en varios aspectos clave, que pueden ser explotados individualmente o en combinación para lograr el éxito en lugar del fallo del estado de la técnica.

5 Mientras que el estudio de la referencia 11 usó un antígeno de *B.pertussis* de célula completa, y encontró una reducción en la inmunogenicidad del MenC, en un primer aspecto de la invención un antígeno del conjugado del MenC es co-administrado con antígeno(s) de *B.pertussis* acelular(es), y no se ha observado pérdida de inmunogenicidad. La situación contrasta con la experiencia previa con los conjugados Hib, que son generalmente compatibles con la tosferina de células completas pero de los que se ha informado a menudo de ser incompatibles con la tosferina acelular. También contrasta con la experiencia previa con los conjugados neumocócicos, donde las respuestas de los anticuerpos eran reducidas cuando se co-administraban con antígeno(s) de *B.pertussis* 10 acelular(es) pero no eran reducidas si se usaba un antígeno celular [2]. El uso de antígenos acelulares, en lugar de celulares, ofrece ventajas en términos de seguridad y reactogenicidad.

15 Además, mientras que el estudio de la referencia 11 administró la vacuna MenC/Pnc9 al mismo tiempo que una vacuna contra la polio oral ('OPV'), y encontró una reducción en la inmunogenicidad del MenC, en un segundo aspecto de la invención se co-administra un antígeno conjugado del MenC con una vacuna contra la polio en una forma inyectable, como una vacuna contra poliovirus inactivado ('IPV'), y no se ha observado pérdida de inmunogenicidad. El uso de IPV en lugar de OPV elimina el riesgo de parálisis asociada a la vacuna contra la polio.

20 Adicionalmente, mientras que el estudio de la referencia <sup>00</sup> usó una composición de vacuna en la que los conjugados neumocócicos y MenC se suministraron en una combinación premezclada, y se encontró una reducción en la inmunogenicidad del MenC, en un tercer aspecto de la invención se suministra un antígeno conjugado del MenC separadamente de los conjugados neumocócicos, en la forma de un kit de partes, y no se ha observado pérdida de la inmunogenicidad. Los conjugados neumocócicos y de MenC se administran a un paciente de forma 25 separada (por ejemplo, en sitios diferentes). La fabricación y distribución de un kit es menos conveniente que para una vacuna combinada completamente líquida, pero este tipo de kit está actualmente en uso (por ejemplo en el producto INFARIX HEXA™) y el inconveniente puede ser más que compensado por la inmunogenicidad y estabilidad aumentadas de los antígenos.

30 Además, mientras que el estudio de la referencia 11 usó una composición de vacuna en la que los conjugados neumocócicos y de MenC se suministraron como una combinación liofilizada, y encontró una reducción en la inmunogenicidad del MenC, en un cuarto aspecto de la invención se suministra un antígeno conjugado neumocócico en un forma líquida, y no se ha observado pérdida de la inmunogenicidad. El conjugado de MenC puede estar en forma liofilizada, o puede estar también en forma líquida. Suministrar el conjugado neumocócico en 35 forma líquida evita la necesidad de su reconstitución en el momento del uso, y también permite que sea usado para reconstituir cualquier otro componente inmunogénico que esté en forma liofilizada.

40 Adicionalmente, mientras que el estudio de la referencia 11 uso una composición de vacuna en la que los conjugados neumocócicos y de MenC se suministraron en combinación con un adyuvante de fosfato de aluminio, y se encontró una reducción en la inmunogenicidad del MenC, en un quinto aspecto de la invención se puede suministrar un antígeno conjugado meningocócico sin un adyuvante de fosfato de aluminio, y no se ha observado pérdida de la inmunogenicidad. El adyuvante de fosfato de aluminio puede ser reemplazado con un adyuvante de hidróxido de aluminio, o es posible no incluir adyuvante de aluminio en absoluto. También son posibles disposiciones 45 alternativas adicionales de sales de aluminio.

Finalmente, en un sexto aspecto de la invención, se administran un conjugado de MenC y uno neumocócico con un antígeno de la tosferina acelular y un antígeno de poliovirus inactivado, y los dos conjugados usan la misma proteína portadora. Usar una proteína portadora común reduce el número total de antígenos diferentes que se 50 presentan simultáneamente al sistema inmune, y también ofrece una mayor comodidad durante la fabricación. Si se administra más de un conjugado neumocócico cada conjugado neumocócico puede tener la misma proteína portadora, o puede haber diferentes proteínas portadoras, pero al menos uno de los conjugados neumocócicos tendrá la misma proteína portadora que el conjugado de MenC.

55 Estos seis aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

La referencia 3, publicada en Diciembre del 2004, describe un estudio en el que se co-administró INFANRIX HEXA™ (GSK) a bebés, en muslos separados, con MENINGITEC™ (Wyeth). La INFANRIX HEXA™ se suministra como una formulación D-T-Pa-HBsAg-IPV líquida con un componente del Hib liofilizado adicional, y el componente del Hib es resuspendido con la formulación líquida 5-valente en el momento del uso para dar una vacuna combinada 60 6-valente. La MENINGITEC™ se suministra como una formulación líquida que contiene un adyuvante de fosfato de aluminio. Por el contrario, con el quinto aspecto de la presente invención se puede suministrar un antígeno conjugado meningocócico sin un adyuvante de fosfato de aluminio. También, al contrario que la referencia 3, en un séptimo aspecto de la invención se puede suministrar un antígeno conjugado meningocócico de una forma liofilizada. Esta forma liofilizada será reconstituida en forma acuosa antes de la inyección, y la reconstitución puede 65 usar un portador acuoso separado, para la co-administración con una formulación que contiene D-T-Pa.

La referencia 4 divulga un estudio en el que una vacuna conjugada meningocócica C se co-administró con una vacuna D-T-Pa-IPV-Hib 5-valente. La referencia 5 divulga un estudio en el que la vacuna conjugada neumocócica C se co-administró con una vacuna D-T-Pa-IPV-Hib 5-valente. Ninguna de estas vacunas 5-valentes incluía un componente HBsAg. La referencia 6 divulga estudios en los que (a) el HBsAg se administró al mismo tiempo que una vacuna conjugada neumocócica en bebés, y (b) se administraron vacunas contra D-T-Pa y Hib separadas al mismo tiempo que una vacuna conjugada neumocócica en niños. La referencia 7 describe un estudio en el que una vacuna conjugada meningocócica C se co-administró con una vacuna contra D-T-Pa-Hib 4-valente. En un octavo aspecto de la invención, los conjugados del serogrupo C meningocócico y neumocócicos se administraron con un antígeno de superficie de la hepatitis B. En un noveno aspecto de la invención, los conjugados del serogrupo C meningocócico y neumocócicos se administraron con un antígeno del poliovirus inactivado.

La referencia 8 describe un estudio en el que una vacuna contra D-T-Pa-HBV-IPV-Hib 6-valente se co-administró con una vacuna conjugada neumocócica 7-valente, pero no se usaron conjugados meningocócicos. Las referencias 9 y 10 describen varias vacunas combinadas posibles, que pueden incluir conjugados meningocócicos, pero se carece de detalles específicos, por ejemplo, no hay divulgación del estado de O-acetilación de los sacáridos del serogrupo C meningocócicos propuestos.

#### **Uso de antígeno(s) de tosferina acelular(es)**

Se co-administra un antígeno conjugado del MenC ('MCC') con antígeno(s) de *B.pertussis* acelular(es), habitualmente conocidos como 'Pa'. Los antígenos de MCC y Pa se administran a un paciente de forma separada.

Adicionalmente a los antígenos de *B.pertussis* acelulares, el tercer componente inmunogénico incluye un toxoide de difteria; un toxoide de tétano; un HBsAg; un antígeno de poliovirus inactivado; y opcionalmente, un antígeno de Hib conjugado.

El kit también incluye un componente que incluye un antígeno sacárido neumocócico conjugado.

#### **Uso de una vacuna contra la polio inyectable**

Un antígeno del MenC conjugado ('MCC') se co-administra con un antígeno de poliovirus inyectable, como la vacuna contra la polio inactivada ('IPV'), también conocida como vacuna Salk. Los antígenos del MCC e IPV se administran a un paciente de forma separada.

Además de la IPV, el tercer componente inmunogénico incluye un toxoide de difteria; un toxoide de tétano; un HBsAg; un antígeno de tosferina acelular; y, opcionalmente, un antígeno de Hib conjugado.

El kit también incluye un componente que incluye un antígeno sacárido neumocócico conjugado.

#### **Suministrar el MenC como un componente del kit separado**

Un antígeno conjugado del MenC ('MCC') se suministra de forma separada de los conjugados neumocócicos ('PnC'), en la forma de un kit de piezas.

Ni el primer ni el segundo componente contiene un toxoide de difteria. El toxoide de difteria se incluye dentro de un tercer componente del kit. De manera similar, ni el primer ni el segundo componente contiene un toxoide de tétano. El toxoide de tétano se incluye dentro de un tercer componente del kit. De manera similar, ni el primer ni el segundo componente contiene un antígeno de tosferina. El antígeno de tosferina se incluye dentro de un componente adicional del kit. De manera similar, ni el primer ni el segundo componente contiene un HBsAg. El HBsAg se incluye dentro de un tercer componente del kit. De manera similar, donde ni el primer ni el segundo componente contiene un conjugado de Hib, el conjugado de Hib puede estar incluido dentro de un componente adicional del kit. Ni el primer ni el segundo componente contiene un IPV. El IPV se incluye dentro de un tercer componente del kit.

Los antígenos de difteria, tétano y tosferina se incluyen juntos dentro del mismo componente en el kit.

#### **Conjugados neumocócicos líquidos**

Se suministra un antígeno conjugado neumocócico en una forma líquida. Se puede suministrar un conjugado del MenC co-administrado: (i) por separado, en forma liofilizada; o (ii) por separado, también en una forma líquida.

El componente de MCC puede ser una formulación acuosa o una formulación liofilizada.

Se proporcionan en el kit un toxoide de difteria; un toxoide de tétano; antígeno(s) de *B.pertussis*; un HBsAg; y un antígeno de poliovirus inactivado como un tercer componente inmunogénico. El kit puede incluir un antígeno del Hib conjugado en el primer o el segundo (o tercer) componente.

5 **Adyuvante de fosfato de aluminio con MenC**

10 Se puede suministrar un antígeno conjugado meningocócico sin un adyuvante de fosfato de aluminio. El adyuvante de fosfato de aluminio puede ser reemplazado con un adyuvante de hidróxido de aluminio, o es posible no incluir ningún adyuvante de aluminio en absoluto. Se suministra un conjugado neumocócico co-administrado con un adyuvante de fosfato de aluminio.

15 En las disposiciones preferidas, el segundo componente inmunogénico no incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, pero puede incluir un adyuvante de hidróxido de aluminio. Como alternativa, puede no incluir sales de aluminio, en cuyo caso puede incluir un adyuvante de hidróxido de aluminio, o puede no incluir ningún adyuvante en absoluto.

20 En una disposición alternativa, en donde el fosfato de aluminio está permitido en el segundo componente, el segundo componente puede incluir una mezcla de adyuvantes de hidróxido y de fosfato de aluminio.

25 En una disposición alternativa adicional, se permite un adyuvante de fosfato de aluminio en el segundo componente, y el componente conjugado meningocócico es adsorbido a un adyuvante de fosfato de aluminio. El conjugado neumocócico puede también ser adsorbido a un adyuvante de fosfato de aluminio.

El kit incluye adicionalmente un toxoide de difteria; un toxoide de tétano; un antígeno de tosferina; un HBsAg; y un antígeno de poliovirus inactivado. También puede incluir un antígeno de Hib.

**Proteínas portadoras para el MenC y PnC**

30 Los conjugados del MenC y neumocócicos se administran con un antígeno de tosferina acelular y un antígeno de poliovirus inactivado, y los dos conjugados usan la misma proteína portadora. A pesar de los riesgos de la supresión inducida por el portador, se ha descubierto en la presente que los conjugados del MenC y neumocócicos no interfieren entre sí, lo que contrasta con las sugerencias de los autores en la referencia 11.

35 Usar "la misma" proteína portadora no significa que hay una única molécula de proteína portadora a la que tanto el sacárido neumocócico como el meningocócico se unen (véase la referencia 12). Más bien, los dos conjugados están separados entre sí, pero el portador usado en el primer conjugado es el mismo portador usado en el segundo conjugado, por ejemplo, los sacáridos neumocócicos están conjugados a la CRM197, y los sacáridos meningocócicos también están conjugados a la CRM197, pero no hay CRM197 al que tanto el sacárido neumocócico como el meningocócico están conjugados. Por lo tanto los conjugados se preparan por separado y se combinan posteriormente.

40 Si al composición o el kit incluye sacáridos de más de un serogrupo de *N.meningitidis*, la invención requiere que la misma proteína portadora se use para al menos uno de los conjugados de *S.pneumoniae* y al menos uno de los conjugados de *N.meningitidis*. En algunas realizaciones, la misma proteína portadora se usará para todos los conjugados de *S.pneumoniae* y al menos uno de los conjugados de *N.meningitidis*. En otras realizaciones, la misma proteína portadora se usará para todos los conjugados de *S.pneumoniae* y todos los conjugados de *N.meningitidis*. La elección del portador se discute con más detalle a continuación.

45 Donde la composición o el kit incluye un sacárido de Hib conjugado la proteína portadora en el sacárido de Hib puede ser la misma que la del portador en los conjugados neumocócicos o meningocócicos, o el conjugado de Hib puede usar un portador diferente.

50 Donde la composición o el kit incluye un toxoide de tétano la proteína portadora en el conjugado neumocócico y el conjugado meningocócico no es preferiblemente un toxoide de tétano. En algunas realizaciones, ninguno de los conjugados neumocócicos y los conjugados meningocócicos tienen un portador toxoide de tétano.

55 Donde al composición o el kit incluye un toxoide de difteria la proteína portadora en el conjugado neumocócico y el conjugado meningocócico no es preferiblemente un toxoide de difteria. En algunas realizaciones, ninguno de los conjugados neumocócicos y los conjugados meningocócicos tiene un portador toxoide de difteria.

60 Donde la composición o el kit incluye tanto un toxoide de difteria como un toxoide de tétano la proteína portadora en los conjugados neumocócicos y meningocócicos no es preferiblemente ni un toxoide de difteria ni un toxoide de tétano.

65

**Liofilización del MenC**

En un séptimo aspecto de la invención, se suministra un antígeno conjugado del serogrupo C meningocócico de una forma liofilizada en un kit que también incluye una formulación que contiene D-T-Pa acuosa.

Por lo tanto, la invención proporciona un kit que comprende un primer componente inmunogénico y un segundo componente inmunogénico, en donde: (a) el primer componente inmunogénico comprende una formulación acuosa de un toxoide de difteria, un toxoide de tétano y un antígeno de *B.pertussis* acelular; y (b) el segundo componente inmunogénico comprende un sacárido capsular conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*, en forma liofilizada.

El conjugado del MenC liofilizado será reconstituido en forma acuosa antes de la inyección. El paso de reconstitución puede usar (a) la formulación que contiene D-T-Pa acuosa, para dar una vacuna combinada que incluye el conjugado del MenC o (b) un portador acuoso separado, para dar una segunda inyección para la co-administración con una inyección que contiene D-T-Pa, en cuyo caso el kit puede incluir un portador acuosos como un componente adicional.

La formulación que contiene D-T-Pa puede también incluir uno o ambos de: un antígeno de superficie de la hepatitis B; y un antígeno de poliovirus inactivado.

También puede ser incluido dentro del kit un antígeno de Hib conjugado. Puede ser incluido en forma liofilizada (por ejemplo, en el mismo contenedor que el componente del MenC liofilizado) o dentro de la formulación que contiene D-T-Pa.

**Administración de MenC, PnC y HBsAg**

Los conjugados del serogrupo C meningocócicos y neumocócicos se administran con un antígeno de superficie de la hepatitis B.

**Administración de MenC, PnC e IPV**

Los conjugados del serogrupo C meningocócicos y neumocócicos se administran con un antígeno de poliovirus inactivado.

Un único componente del kit incluye todos de un antígeno de poliovirus inactivado; un toxoide de difteria; un toxoide de tétano; un antígeno de *B.pertussis*; y un HBsAg.

**Sacáridos de *N.meningitidis* Conjugados**

Los antígenos meningocócicos conjugados comprenden antígenos sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* conjugados con proteínas portadoras. Las vacunas monovalentes conjugadas contra el serogrupo C han sido aprobadas para uso humano, e incluyen MENJUGATE™ [13], MENINGITEC™ y NEISVAC-C™. Se conocen mezclas de conjugados de los serogrupos A+C [14, 15] y se ha informado de mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y [16-19] y se aprobaron en el 2005 como el producto MENACTRA™.

La invención usa al menos un sacárido meningocócico del serogrupo C, pero puede también incluir sacárido de uno o más de los serogrupos A, W135 y/o Y, por ejemplo, A+C, C+W135, C+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y. Donde se usa más de un serogrupo se prefiere usar tanto los serogrupos A como C.

El sacárido capsular del serogrupo C meningocócico es un homopolímero  $\alpha 2 \rightarrow 9$ -ligado de ácido siálico (ácido N-acetil-nueramínico), típicamente con grupos O-acetilo (OAc) en los residuos C-7 o C-8. El compuesto se representa como:  $\rightarrow 9$ -Neu p Nac 7/8 OAc-( $\alpha 2 \rightarrow$

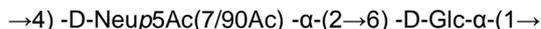
Algunas cepas de MenC (~12% de aislados invasivos) producen un polisacárido que carece de su grupo OAc. La presencia o ausencia de los grupos OAc genera epítomos únicos, y la especificidad del anticuerpo que enlaza con el sacárido puede afectar a su actividad bactericida contra las cepas O-acetiladas (OAc-) y de-O-acetiladas (OAc+) [20-22]. Las vacunas conjugadas de MenC con licencia incluyen tanto el sacárido Oac-(NEISVAC-C™) como el Oac+ (MENJUGATE™ & MENINGITEC™). Los sacáridos del serogrupo C usados con la invención pueden ser preparados de cepas o OAc+ o OAc-. Las cepas preferidas para la producción de los conjugados del serogrupo C son las cepas OAc+, preferiblemente del serotipo 16, preferiblemente del serosubtipo P1.7a, 1Por lo tanto se prefieren las cepas C:16:P1.7a, 1 OAc+. Las cepas OAc+ en el serosubtipo P1.1 son también útiles, como la cepa C11.

El sacárido capsular del serogrupo A meningocócico es un homopolímero de ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )-ligado N-acetil-D-manosamina-1-fosfato, con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser del 70-95%. Las condiciones usadas para purificar el sacárido pueden resultar en la de-O-acetilación (por

ejemplo bajo condiciones básicas), pero se prefiere conservar la OAc en esta posición C-3. Por lo tanto, preferiblemente al menos el 50% (por ejemplo, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de los residuos de manosamina son O-acetilados en la posición C-3.

5 El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades disacáridas de ácido siálico-galactosa. Como el sacárido del serogrupo C, tiene O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [23]. La estructura se escribe como:  $\rightarrow 4$ )-D-Neup5Ac(7/9OAc)- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-D-Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$

10 El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición del disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. Como el serogrupo W135, tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [23]. La estructura del serogrupo Y se escribe como:



15 Los productos MENJUGATE™ y MENINGITEC™ usan una proteína portadora CRM197, y este portador puede también ser usado de acuerdo con la invención. El producto NEISVAC-C™ usa una proteína portadora de toxoide de tétano, y este portador puede también ser usado de acuerdo con la invención, como puede ser el toxoide de difteria. Otra proteína portadora útil para los conjugados meningocócicos es la proteína D de la *Haemophilus influenzae*, que no está presente en ninguna vacuna conjugada aprobada existente.

20 La fracción sacárida del conjugado puede comprender sacáridos de longitud completa como las preparadas de meningococos, y/o puede comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa. Los sacáridos usados de acuerdo con la invención son preferiblemente más cortos que los sacáridos capsulares nativos vistos en las bacterias. Por lo tanto los sacáridos están preferiblemente despolimerizados, con la despolimerización teniendo lugar después de la purificación del sacárido pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. Un método de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [16]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (por ejemplo, para dar una concentración final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 1%), y la mezcla es después incubada (por ejemplo, a alrededor de 55° C) hasta que se ha conseguido una reducción de la longitud de la cadena deseada. Otro método de despolimerización implica la hidrólisis ácida [17]. En la técnica se conocen otros métodos de despolimerización. Los sacáridos usados para preparar conjugados para el uso de acuerdo con la invención pueden ser obtenibles por cualquiera de estos métodos de despolimerización. La despolimerización se puede usar para proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de la cadena para la manejabilidad física de los sacáridos. Los sacáridos preferidos tienen el siguiente intervalo de grados medios de polimerización (Dp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25; Y=5-25. En términos de peso molecular, en lugar del Dp, los intervalos preferidos son, para todos los serogrupos: <100kDa; 5kDa-75kDa; 7kDa-50kDa; 8kDa-35kDa; 12kDa-25kDa; 15kDa-22kDa.

35 Se pueden usar conjugados meningocócicos con una proporción sacárido proteína (p/p) de entre 1:10 (es decir proteína en exceso) y 10:1 (es decir sacárido en exceso), por ejemplo, proporciones entre 1:5 y 5:1, entre 1:2.5 y 2.5:1, o entre 1:1.25 y 1.25:1. Se puede usar una proporción de 1:1, particularmente para el serogrupo C. Típicamente, una composición incluirá entre 1 µg y 20 µg (medido como sacárido) por dosis de cada serogrupo que está presente.

40 La administración de un conjugado resulta preferiblemente en un aumento en el título ensayo bactericida en suero (SBA) para el serogrupo relevante de al menos 4 veces, y preferiblemente de al menos 8 veces. Los títulos SBA se pueden medir usando complemento de cría de conejo o complemento humano [24].

Los conjugados meningocócicos pueden o pueden no ser adsorbidos a un adyuvante de sal de aluminio.

50 Los conjugados meningocócicos pueden ser liofilizados antes del uso de acuerdo con la invención. Si son liofilizados, la composición puede incluir un estabilizador como manitol. También podría incluir cloruro sódico.

#### Sacáridos neumocócicos conjugados

55 Los antígenos neumocócicos conjugados comprenden antígenos sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con proteínas portadoras [por ejemplo, referencias 25 a 27]. La PREVNAR™ [29] comprende antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con la CRM197 por aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0.5 ml (4 µg del serotipo 6B).

60 Las composiciones de la invención incluyen antígenos sacáridos para al menos los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Los serotipos adicionales son preferiblemente seleccionados de: 1, 3, 5 y 7F. La cobertura de los serotipos neumocócicos 7-valentes (como en PREVNAR™), 9-valentes (por ejemplo los 7 serotipos del PREVNAR, más 1&5), 10-valentes (por ejemplo los siete serotipos del PREVNAR, más 1, 5 & 7F) y 11-valentes (por ejemplo los 7 serotipos de PREVNAR, más 1, 3, 5, & 7F) son particularmente útiles.

La fracción sacárida del conjugado puede comprender sacáridos de longitud completa como las preparadas de los neumococos, y/o puede comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa. Los sacáridos usados de acuerdo con la invención son preferiblemente más cortos que los sacáridos capsulares nativos vistos en las bacterias, como se ha descrito anteriormente para los conjugados meningocócicos.

Se pueden usar conjugados neumocócicos con una proporción sacárido:proteína (p/p) de entre 1:10 (es decir exceso de proteína) y 10:1 (es decir exceso de sacárido), por ejemplo, proporciones entre 1:5 y 5:1, entre 1:2.5 y 2.5:1, o entre 1:1.25 y 1.25:1.

El producto PREVNAR™ usa una proteína portadora de la CRM197, y este portador puede ser también usado de acuerdo con la invención. Portadores alternativos para el uso con sacáridos neumocócicos incluyen, pero no están limitados a, un portador de toxoide de tétano, un portador de toxoide de difteria, y/o un portador de proteína D de *H.influenzae*. El uso de portadores múltiples para serotipos neumocócicos mixtos puede ser ventajoso [30], por ejemplo, incluir tanto el portador de proteína D de *H.influenzae* como por ejemplo un portador de toxoide de tétano y/o portador de toxoide de difteria. Por ejemplo, uno o más (preferiblemente todos) los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F se pueden conjugar con un portador de proteína D de *H.influenzae*, el serotipo 18C se puede conjugar con un toxoide de tétano, y el serotipo 19F se puede conjugar con un portador de toxoide de difteria.

Típicamente, una composición incluirá entre 1 µg y 20 µg (medido como sacárido) por dosis de cada serotipo que esté presente.

#### Antígenos de tosferina

La *bordetella pertussis* causa tos convulsiva. Los antígenos de la tosferina en vacunas son o celulares (célula completa, en la forma de células de *B.pertussis* inactivadas) o acelulares. La preparación de los antígenos de tosferina celulares está bien documentada [por ejemplo ver capítulo 21 de la referencia 1], por ejemplo, se pueden obtener por inactivación por calor del cultivo de fase I de la *B.pertussis*. La invención usa antígenos acelulares.

Se prefiere usar uno, dos o (preferiblemente) tres de los antígenos siguientes: (1) toxina de tosferina destoxificada (toxóide de tosferina, o 'PT'); (2) hemaglutinina filamentosa ('FHA'); (3) pertactina (también conocida como la 'proteína de la membrana exterior 69 kiloDalton'). Estos tres antígenos son preferiblemente preparados por aislamiento del cultivo de *B.pertussis* cultivado en medio líquido Stainer-Scholte modificado. La PT y la FHA pueden ser aislados del caldo de fermentación (por ejemplo, por adsorción en gel de hidroxipatita), mientras la pertactina puede ser extraída de células por tratamiento por calor y floculación (por ejemplo, usando cloruro de bario). Los antígenos pueden ser purificados en pasos cromatográficos y/o de precipitación sucesivos. La PT y la FHA pueden ser purificadas por, por ejemplo, cromatografía hidrofóbica, cromatografía por afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño. La pertactina puede ser purificada por, por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía hidrofóbica y cromatografía de exclusión por tamaño. La FHA y la pertactina pueden ser tratadas con formaldehído antes del uso de acuerdo con la invención. La PT es preferiblemente destoxificada por tratamiento con formaldehído y/o glutaraldehído. como una alternativa a este procedimiento de destoxificación química la PT puede ser una PT mutante en la que la actividad enzimática ha sido reducida por mutagénesis [31], pero se prefiere la destoxificación por tratamiento químico.

Los antígenos de tosferina acelulares están preferiblemente adsorbidos en uno o más adyuvantes de sal de aluminio. Como una alternativa, pueden ser añadidos en un estado no adsorbido. Cuando se añade pertactina está preferiblemente ya adsorbido en un adyuvante de hidróxido de aluminio. La Pt y la FHA pueden estar adsorbidas en un adyuvante de hidróxido de aluminio o un fosfato de aluminio. Se prefiere la adsorción de todos de PT, FHA y pertactina a hidróxido de aluminio.

Las composiciones incluirán típicamente: 1-50 µg/dosis de PT; 1-50 µg/dosis de FHA; y 1-50 µg de pertactina. Las cantidades preferidas son de alrededor de 25 µg/dosis de PT, alrededor de 25 µg/dosis de FHA y alrededor de 8 µg/dosis de pertactina.

Así como la PT, FHA y la pertactina, es posible incluir fimbrias (por ejemplo, aglutinógenos 2 y 3) en una vacuna contra la tosferina acelular.

#### Vacuna contra el poliovirus inactivada

El poliovirus causa la poliomielititis. En lugar de usar la vacuna contra el poliovirus oral, la invención usa la IPV, como se divulga con más detalle en el capítulo 24 de la referencia 1.

Los poliovirus pueden ser cultivados en cultivo celular, y un cultivo preferido usa una línea celular Vero, derivada de riñón de hígado. Las células Vero pueden ser convenientemente cultivadas en microportadores. Después del crecimiento, los viriones pueden ser purificados usando técnicas como ultrafiltración, diafiltración, y cromatografía. Antes de la administración a pacientes, los poliovirus deben ser inactivados, y esto se puede conseguir por tratamiento con formaldehído.

La poliomielitis puede ser causado por uno de tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y causan síntomas idénticos, pero son antigénicamente muy diferentes y al infección por un tipo no protege contra la infección por los otros. Se prefiere por lo tanto usar tres antígenos de poliovirus en la invención: poliovirus Tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), poliovirus Tipo 2 (por ejemplo cepa MEF-1), y poliovirus Tipo 3 (por ejemplo cepa Saukett). Los virus son preferiblemente cultivados, purificados e inactivados individualmente, y son después combinados para dar una mezcla trivalente a granel para el uso con la invención.

Las cantidades de IPV se expresan típicamente en la unidad 'DU' (la "unidad D-antígeno" [32]). Se prefiere usar entre 1-100 DU por tipo viral por dosis, por ejemplo, alrededor de 80 DU del poliovirus Tipo 1, alrededor de 16 DU del poliovirus Tipo 2, y alrededor de 64 DU de poliovirus tipo 3.

Los antígenos de poliovirus están preferiblemente no adsorbidos a ningún adyuvante de sal de aluminio antes de ser usados para hacer las composiciones de la invención, pero se pueden volver adsorbidos en adyuvante(s) de aluminio en la composición de la vacuna durante el almacenamiento.

#### Toxoides de difteria

La *Corynebacterium diphtheriae* causa la difteria. La toxina de la difteria puede ser tratada (por ejemplo usando formalina o formaldehído) para eliminar la toxicidad mientras se mantiene la capacidad de inducir anticuerpos anti-toxina específicos después de la inyección. Estos toxoides de difteria se usan en vacunas contra la difteria, y se divulgan con mayor detalle en el capítulo 13 de la referencia 1. Los toxoides de difteria preferidos son aquellos preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide de la difteria se puede obtener cultivando *C.diphtheriae* seguido con tratamiento de formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material toxoide puede ser entonces tratado por un proceso que comprende la filtración y/o diálisis estéril.

Las cantidades de toxoide de difteria se pueden expresar en unidades internacionales (IU). Por ejemplo, la NIBSC suministra el 'Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999' [33, 34] que contiene 160 IU por ampolla. Como una alternativa al sistema IU, la unidad 'Lf' ("unidades floculantes" o la "dosis floculante de limas") se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una Unidad Internacional de antitoxina, produce una mezcla floculante óptima [35]. Por ejemplo, el NIBSC suministra el 'Diphtheria Toxoid, Plain' [36], que contiene 300 LF por ampolla, y también suministra el 'The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test' [37] que contiene 900 LF por ampolla.

Las composiciones típicamente incluyen entre 20 y 80 Lf de toxoide de difteria, típicamente alrededor de 50 Lf.

Por mediciones IU, las composiciones incluirán típicamente al menos 30 IU/dosis.

El toxoide de difteria está preferiblemente adsorbido en un adyuvante de hidróxido de aluminio.

#### Toxoides de tétano

El *Clostridium tetani* causa el tétano. La toxina del tétano puede ser tratada para dar un toxoide protector. Los toxoides se usan en las vacunas contra el tétano, y se divulgan con mayor detalle en el capítulo 27 de la referencia 1. Los toxoides de tétano preferido son aquellos preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide del tétano se puede obtener cultivando *C.tetani* en medio de crecimiento (por ejemplo, un medio Latham derivado de caseína bovina), seguido por tratamiento de formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material puede ser entonces tratado por un proceso que comprende filtración y/o diálisis estéril.

Las cantidades de toxoide de tétano pueden ser expresadas en unidades internacionales (IU). Por ejemplo, el NIBSC proporciona el 'Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000' [38, 39], que contiene 469 IU por ampolla. Como una alternativa al sistema IU, la unidad 'Lf' ("unidades floculantes" o la "dosis floculante de limas") se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una Unidad Internacional de antitoxina, produce una mezcla floculante óptima [35]. Por ejemplo, el NIBSC proporciona el 'The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test' [40] que contiene 1000 LF por ampolla.

Las composiciones incluirán típicamente entre 5 y 50 Lf de toxoide de difteria, típicamente alrededor de 20 Lf.

Por mediciones IU, las composiciones incluirán típicamente al menos 40 IU/dosis.

El toxoide de tétano puede estar adsorbido en un adyuvante de hidróxido de aluminio, pero esto no es necesario (por ejemplo, se puede usar adsorción de entre el 0-10% del toxoide de tétano total).

Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B

El virus de la hepatitis B (HBV) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis vírica. El virión del HBV consiste de un núcleo interno rodeado por un recubrimiento de proteína exterior o cápside, y el núcleo vírico contiene el genoma de ADN vírico. El componente principal de la cápside es una proteína conocida como antígeno de superficie del HBV o , más comúnmente, 'HBsAg' que es típicamente un polipéptido de 226 aminoácidos con un peso molecular de ~24 kDa. Todas las vacunas contra la hepatitis B existentes contienen HBsAg, y cuando este antígeno se administra a una vacuna normal estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg que protegen contra la infección del HBV.

Para la fabricación de las vacunas, el HBsAg se ha hecho de dos maneras. El primer método implica purificar el antígeno en forma de partículas del plasma de portadores de hepatitis B crónica, ya que se sintetizan grandes cantidades de HBsAg en el hígado y se liberan en el torrente sanguíneo durante la infección por HBV. LA segunda manera implica expresar la proteína por métodos de ADN recombinantes. El HBsAg para el uso con el método de la invención es preferiblemente expresado recombinantemente en células de levadura. Las levaduras adecuadas incluyen, por ejemplo, huésped *Saccharomyces* (como *S.cerevisiae*) o *Hanensula* (como *H.polymorpha*).

El HBsAg está preferiblemente no glicosilado. A diferencia del HBsAg nativo (es decir, en el producto purificado del plasma), el HBsAg expresado en levadura está generalmente no glicosilado, y esta es la forma más preferida de HBsAg para el uso con la invención, porque es altamente inmunogénica y puede ser preparada sin el riesgo de contaminación del producto sanguíneo.

El HBsAg estará generalmente en la forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro medio de alrededor de 20 nm), incluyendo una matriz lipídica que comprende fosfolípidos. Las partículas de HBsAg expresadas en levadura pueden incluir fosfatidilinositol, que no se encuentra en los viriones de HBV naturales. Las partículas pueden también incluir una cantidad no tóxica de LPS para estimular el sistema inmune [41]. El HBsAg preferido está en la forma de partículas que incluyen una matriz lipídica que comprende fosfolípidos, fosfatidilinositol y polisorbato 20.

Todos los subtipos conocidos de HBV contienen el determinante común 'a'. Combinado con otros determinantes y subdeterminantes, se han identificado nueve subtipos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- and adrq+. Además de estos subtipos, han emergido otras variantes, como mutantes de HBV que han sido detectados en individuos inmunizados ("mutantes de escape"). El subtipo de HBV más preferido para el uso con la invención es el subtipo adw2. Un HBsAG preferido tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1):

```
MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPPI
CPGYRWMCLRRFIIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPKCTCTTPAQGNSMFPS
CCCTKPTDGNCTCIPIPISSWAFAYKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPS
LYSIVSPFIPLLPFIFFCLWVYI
```

Esta secuencia difiere de las coincidencias de la base de datos más cercana en el aminoácido 117, teniendo un residuo Asn en lugar de Ser. La invención puede usar la SEQ ID NO: 1, o una secuencia diferente de la SEQ ID NO: 1 por hasta 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10) sustituciones de aminoácidos individuales.

Además de la secuencia 's', un antígeno de superficie puede incluir toda o parte de una secuencia pre-S, como toda o parte de una secuencia pre-S1 y/o pre-S2.

El HBsAg es expresado preferiblemente: (1) bajo el control de un promotor secuencia arriba de un gen de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; y/o (2) con un terminador de la transcripción ARG3 secuencia abajo.

El gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es un enzima glicolítico, y se ha descubierto que su promotor es particularmente adecuado para controlar la expresión del HBsAg en la *S.cerevisiae* [24]. Un promotor de GAPDH preferido comprende la siguiente secuencia de nucleótidos 1060-mer (SEQ ID NO: 2):

AAGCTTACCAGTTCTCACACGGAACACCCTAATGGACACACATTTCGAAATACTTTGACCCTATTTTC  
 GAGGACCTTGTCACCTTGAGCCCAAGAGAGCCAAGATTTAAATTTTCCTATGACTTGATGCAAATTC  
 CAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAGACATATTTGACCTCTTAACAGGTTTCAGACG  
 CGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTTGAAAAGAACTTACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTG  
 AATGTTAGCGTCAACAACAAGAAGTTTACTGACGCGGAGGCCAAGGCAAAAAGATTCCCTTGATTACGT  
 AAGGGAGTTAGAATCATTGTAATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTG  
 CCATTTCAAAGAATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTATTTAGTCAAAAAATTAG  
 CCTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACATC  
 GTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTG  
 GCATCCAGAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGT  
 CCATTTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAACGGGCACAACCTCAATGG  
 AGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATT  
 TTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCA  
 GTTCCCTGAAATTATTTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCT  
 GTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAACAC  
 CAAGAACTTAGTTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAA

5 Esta secuencia difiere de la secuencia en la referencia 42 como sigue: (1) la sustitución de A/C en el nucleótido 42; (2) la sustitución de T/A en el nucleótido 194; (3) la mutación de C/A en el nucleótido 30-1; (4) la inserción a en el nucleótido 471; (5) la sustitución de C/T en el residuo 569; (6) la sustitución de T/C en el residuo 597; (7) la inserción de T en el nucleótido 604 (penta-T en lugar de tetra-T); y (8) el reemplazo de la secuencia 3' GCTT con una única A.

10 La invención puede usar esta secuencia promotora 1060-mer, o una secuencia que difiere de esta secuencia 1060-mer por hasta 20 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20) mutaciones puntuales, cada mutación puntual siendo la delección, sustitución o inserción de un único nucleótido.

La secuencia 1060-mer está preferiblemente inmediatamente secuencia abajo del codón de inicio de ATG que codifica el término N del HBsAg (SEQ ID NO: 3):

AAGCTTACCAGTTCTCACACGGAACACCCTAATGGACACACATTTCGAAATACTTTGACCCTATTTTC  
 GAGGACCTTGTCACCTTGAGCCCAAGAGAGCCAAGATTTAAATTTTCCTATGACTTGATGCAAATTC  
 CAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAGACATATTTGACCTCTTAACAGGTTTCAGACG  
 CGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTTGAAAAGAACTTACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTG  
 AATGTTAGCGTCAACAACAAGAAGTTTACTGACGCGGAGGCCAAGGCAAAAAGATTCCCTTGATTACGT  
 AAGGGAGTTAGAATCATTGTAATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTG  
 CCATTTCAAAGAATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTATTTAGTCAAAAAATTAG  
 CCTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACATC  
 GTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTG  
 GCATCCAGAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGT  
 CCATTTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAACGGGCACAACCTCAATGG  
 AGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATT  
 TTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCA  
 GTTCCCTGAAATTATTTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCT  
 GTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAACAC  
 CAAGAACTTAGTTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAATG . . .

15 El gen ARG3 en levadura codifica la enzima ornitina carbamoiltransferasa [43] y su secuencia de terminación de la transcripción se ha usado en varios sistemas de expresión recombinantes de levadura [44, 45, 46]. Es ventajoso para el control de la expresión del HBsAg en levadura, particularmente en combinación con un promotor GAPDH.

20 El gen que codifica el HBsAg será típicamente un inserto en un plásmido. Un plásmido preferido incluye un promotor GAPDH, seguido por una secuencia que codifica el HBsAg, seguido por un terminador ARG3. Los plásmidos preferidos también pueden incluir uno, dos o los tres de (1) un marcador de selección LEU2; (2) una secuencia plásmida de 2µ; y/o (3) un origen de la replicación funcional en *Escherichia coli* [46]. Por lo tanto los plásmidos preferidos pueden actuar como vectores lanzadera entre la levadura y el *E.coli*.

25 Se prefiere un plásmido con entre 14500 y 15000 bp, por ejemplo, entre 14600 y 14700 bp.

Donde se usa un marcador de selección LEU2 la célula huésped debería ser LEU2<sup>-ve</sup> (es decir, un auxótrofo de leucina). La célula huésped puede ser un mutante *leu2-3 leu2-112*. Características adicionales de los huéspedes de levadura preferidos son *his3 y/o can1-11*. Un huésped de levadura más preferido es *el leu2-3 leu2-112 his3 can1-11*, como la cepa DC5.

Un método preferido para la purificación del HBsAg implica, después de la disrupción celular; ultrafiltración; cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de intercambio de aniones; ultracentrifugación; desalación; y filtración estéril. Los lisados pueden ser precipitados después de la disrupción celular (por ejemplo, usando un polietilenglicol), dejando el HBsAg en la solución, listo para la ultrafiltración.

Después de la purificación el HBsAg puede ser sometido a diálisis (por ejemplo con cisteína), que puede ser usada para eliminar cualquier conservante mercurial como el timerosal que puede haber sido usado durante la preparación del HBsAg [47].

Las cantidades de HBsAg son típicamente expresadas en microgramos, y una cantidad típica de HBsAg por dosis de vacuna está entre 5 y 5 µg, por ejemplo 10 µg/dosis.

Aunque el HBsAg puede estar adsorbido en un adyuvante de hidróxido de aluminio en la vacuna final (como en el producto ENGERIX-B™ bien conocido), o puede permanecer no adsorbido, estará generalmente adsorbido a un adyuvante de fosfato de aluminio [48].

#### Antígenos de la *Haemophilus influenzae* tipo b conjugados

LA *Haemophilus influenzae* tipo b ('Hib') causa meningitis bacteriana. Las vacunas contra el Hib están basadas típicamente en el antígeno sacárido capsular [por ejemplo, capítulo 14 de la referencia 1], la preparación del cual está bien documentada [por ejemplo, referencias 49 a 58].

el sacárido de Hib puede estar conjugado a una proteína portadora para potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. Las proteínas portadoras típicas son el toxoide de tétano, toxoide de difteria, el derivado CRM197 del toxoide de difteria, la proteína D de la *H.influenzae*, y un complejo de la proteína de la membrana exterior del meningococo del serogrupo B. La proteína portadora en el conjugado del Hib es preferiblemente diferente de la(s) proteína(s) portadora(s) en el(los) conjugado(s) meningocócico(s), pero se puede usar el mismo portador en algunas realizaciones.

El toxoide de tétano es el portador preferido, como se usa en el producto referido comúnmente como 'PRT-T'. El PRT-T puede ser hecho inactivando un polisacárido capsular de Hib usando bromuro de cianógeno, acoplado el sacárido activado con un conector de ácido adípico (como (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), típicamente la sal de clorhidrato), y después reaccionando la entidad conector-sacárido con un proteína portadora de toxoide de tétano.

La fracción sacárida del conjugado puede comprender fosfato de polirribosilribitol de longitud completa (PRP) como se prepara de la bacteria del Hib, y/o fragmentos de PRP de longitud completa.

Se pueden usar conjugados de Hib con una proporción sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso), por ejemplo, proporciones entre 1:2 y 5:1 y proporciones entre 1:1.25 y 1:2.5. En las vacunas preferidas, sin embargo, la proporción de peso del sacárido con la proteína portadora está entre 1:2 y 1:4, preferiblemente entre 1:2.5 y 1:3.5. En las vacunas donde el toxoide de tétano está presente tanto como un antígeno como una proteína portadora la proporción de peso del sacárido con la proteína portadora en el conjugado puede estar entre 1:0.3 y 1:2 [59].

Las cantidades de conjugado de Hib se dan generalmente en términos de masa de sacárido (es decir, la dosis del conjugado (portador + sacárido) en conjunto es más alta que la dosis indicada) para evitar la variación debida a la elección del portador. Una cantidad típica de sacárido de Hib por dosis está entre 1-30 µg, preferiblemente alrededor de 10 µg.

La administración del conjugado de Hib resulta preferiblemente en una concentración de anticuerpos anti-PRP de  $\geq 0.15$  µg/ml, y más preferiblemente de  $\geq 1$  µg/ml, y estos son los umbrales de respuesta estándar.

Los conjugados Hib pueden ser liofilizados antes de su uso de acuerdo con la invención. También se pueden añadir componentes adicionales antes del secado por congelación, por ejemplo, estabilizadores. Los estabilizadores preferidos para la inclusión son lactosa, sacarosa y manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. La vacuna final puede por lo tanto contener lactosa y/o sacarosa. Usar una mezcla de sacarosa/manitol puede acelerar el proceso de secado.

Los conjugados de Hib pueden o pueden no estar adsorbidos a un adyuvante de sal de aluminio, se prefiere no adsorberlos a un adyuvante de hidróxido de aluminio.

**Características de las composiciones de la invención**

Además de los componentes antigénicos descritos anteriormente, las composiciones de la invención incluirán generalmente un componente no antigénico. El componente no antigénico puede incluir portadores, adyuvantes, excipientes, reguladores, etc., como se describe con más detalle a continuación. Estos componentes no antigénicos pueden tener varias fuentes. Por ejemplo, pueden estar presentes en uno de los materiales antigénicos o adyuvantes que se usa durante la fabricación o pueden ser añadidos de forma separada a esos componentes.

Las composiciones preferidas de la invención incluyen uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticos.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente en entre 1 y 20 mg/ml.

Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y caerán más preferiblemente dentro del intervalo de 290-320 mOsm/kg. Se ha informado anteriormente que la osmolalidad no tiene un impacto en el dolor causado por la vacunación [60], pero se prefiere a pesar de todo mantener la osmolalidad en este intervalo.

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más reguladores. Los reguladores típicos incluyen, un regulador de fosfato; un regulador Tris; un regulador de borato; un regulador de succinato; un regulador de histidina; o un regulador de citrato. Los reguladores estarán típicamente incluidos en el intervalo de 5-20 mM.

El pH de una composición de la invención estará generalmente entre 5.0 y 7.5, y más típicamente entre 5.0 y 6.0 para la estabilidad óptima, o entre 6.0 y 7.0.

Las composiciones de la invención son preferiblemente estériles.

Las composiciones de la invención son preferiblemente no pirogénicas, por ejemplo, conteniendo <1 EU (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferiblemente <0.1 por dosis.

Las composiciones de la invención están preferiblemente libres de gluten.

En donde los antígenos están adsorbidos, una composición puede ser una suspensión con una apariencia turbia. Esta apariencia significa que la contaminación microbiana no es fácilmente visible, y por lo tanto la vacuna preferentemente contiene un conservante. Esto es particularmente importante cuando la vacuna está envasada en contenedores multidosis. Los conservantes preferidos para la inclusión son 2-fenoxietanol y timerosal. Se recomienda, sin embargo, no usar conservantes mercuriales (por ejemplo timerosal), cuando es posible. Se prefiere que las composiciones de la invención contengan menos de alrededor de 25 ng/ml de mercurio.

La concentración de cualquier sal de aluminio en una composición de la invención, expresada en términos de  $Al^{3+}$ , es preferiblemente menos de 5 mg/ml, por ejemplo,  $\leq 4$  mg/ml,  $\leq 3$  mg/ml,  $\leq 2$  mg/ml,  $\leq 1$  mg/ml, etc.

Las composiciones de la invención se administran preferentemente a pacientes en dosis de 0.5 ml. Se entenderán que las referencias a dosis de 0.5 ml incluyen la varianza normal, por ejemplo  $0.5 \text{ ml} \pm 0.05 \text{ ml}$ .

La invención puede proporcionar material a granel que es adecuado para envasarlo en dosis individuales, que pueden entonces ser distribuidas para la administración a pacientes. Las concentraciones mencionadas anteriormente son típicamente concentraciones en dosis envasada final, y por lo tanto las concentraciones en la vacuna a granel pueden ser más altas (por ejemplo, a ser reducidas a las concentraciones finales por dilución).

El material residual de componentes antigénicos individuales puede también estar presente en cantidades traza en la vacuna final producida por el proceso de la invención. Por ejemplo, si se usa formaldehído para preparar los toxoides de difteria, tétano y tosferina entonces el producto de la vacuna final puede conservar cantidades traza de formaldehído (por ejemplo menos de 10  $\mu\text{g/ml}$ , preferiblemente <5  $\mu\text{g/ml}$ ). Se pueden usar medios o estabilizadores durante la preparación del poliovirus (por ejemplo, Medio 199), y estos pueden ser llevados a la vacuna final. De manera similar, los aminoácidos libres (por ejemplo alanina, arginina, aspartato, cisteína y/o cistina, glutamato, glutamina, glicina, histidina, prolina y/o hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y/o valina), vitaminas (por ejemplo colina, ascorbato, etc.), fosfato disódico, fosfato monopotásico, calcio, glucosa, sulfato de adenina, rojo de fenol, acetato de sodio, cloruro de potasio, etc. pueden ser mantenidos en la vacuna final a  $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ , preferiblemente <10  $\mu\text{g/ml}$ , cada. Otros componentes de las preparaciones de antígenos, como la neomicina (por ejemplo sulfato de neomicina, particularmente del componente del IPV), polimixina B (por ejemplo sulfato de polimixina B, particularmente del componente del IPV), etc. también pueden estar presente, por ejemplo en cantidades de sub-nanogramos por dosis.

Un componente posible adicional de la vacuna final que se origina en las preparaciones de antígenos surge de menos que la purificación total de antígenos. Pueden por lo tanto estar presentes pequeñas cantidades de proteínas de *B.pertussis*, *C.diphtheriae*, *C.tetani* y/o *S.cerevisiae* y/o ADN genómico.

5 El componente del IPV se habrá cultivado generalmente en células Vero. La vacuna final preferiblemente contiene menos de 50 pg/ml de ADN de células Vero, por ejemplo, menos de 50 pg/ml de ADN de células Vero que es  $\geq 50$  pares de base de longitud.

### 10 **Adyuvantes**

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la invención incluyen un adyuvante, y este adyuvante preferiblemente comprende una o más sales de aluminio, y particularmente un adyuvante de fosfato de aluminio y/o un adyuvante de hidróxido de aluminio. Los componentes antigénicos usados para preparar composiciones de la invención incluyen preferiblemente adyuvantes de aluminio antes de ser usados, es decir, son "pre-mezclados" o "pre-adsorbidos" al adyuvante(s).

15 Los adyuvantes de aluminio actualmente en uso son referidos típicamente como adyuvantes de "hidróxido de aluminio" o como de "fosfato de aluminio". Estos nombres de conveniencia, sin embargo, tampoco son un descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo ver capítulo 9 de la referencia 61). La invención puede usar cualquiera de las sales de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes.

20 Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que son al menos parcialmente cristalinos. El oxihidróxido de aluminio, que puede ser representado por la fórmula  $\text{AlO}(\text{OH})$ , se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, como el hidróxido de aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$  por espectroscopia infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a  $1070 \text{ cm}^{-1}$  y un respaldo fuerte a  $3090\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$  (capítulo 9 de la referencia 61).

25 Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, a menudo conteniendo también una pequeña cantidad de sulfato. Pueden ser obtenidos por precipitación, y las condiciones y concentraciones de reacción durante la precipitación pueden influenciar en el grado de sustitución del fosfato para el hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una proporción molar  $\text{PO}_4/\text{Al}$  de entre 0.3 y 0.99. Los hidroxifosfatos pueden ser distinguidos del  $\text{AlPO}_4$  estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a  $3164 \text{ cm}^{-1}$  (por ejemplo cuando se calienta a  $200^\circ \text{ C}$ ) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 61).

30 La proporción molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$  de un adyuvante de fosfato de aluminio estará generalmente entre 0.3 y 1.2, preferiblemente entre 0.8 y 1.2, y más preferiblemente  $0.95 \pm 0.1$ . El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, particularmente por las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0.84 y 0.92, incluido en 0.6 mg de  $\text{Al}^{3+}/\text{ml}$ . El fosfato de aluminio estará generalmente en forma de partículas. Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0.5-20  $\mu\text{m}$  (por ejemplo alrededor de 5-10  $\mu\text{m}$ ) después de cualquier adsorción de antígeno.

35 El PZC del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC es también alterado cambiando la concentración de iones de fosfato libres en la solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un regulador como un regulador de histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán generalmente un PZC de entre 4.0 y 7.0, más preferiblemente entre 5.0 y 6.5, por ejemplo alrededor de 5.7.

40 Una solución de fosfato de aluminio usada para preparar una composición de la invención puede contener un regulador (por ejemplo un regulador de fosfato o de histidina o un Tris), pero esto no es siempre necesario. La solución de fosfato de aluminio es preferiblemente estéril y libre de pirógenos. La solución de fosfato de aluminio puede incluir iones de fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes a una concentración de entre 1.0 y 20 mM, preferiblemente entre 5 y 155 mM, y más preferiblemente de alrededor de 10 mM. La solución de fosfato de aluminio puede también comprender cloruro sódico. La concentración de cloruro sódico está preferiblemente en el intervalo de 0.1 a 100 mg/ml (por ejemplo 0.5-50 mg/ml, 1-20 mg/ml, 2-10 mg/ml) y es más preferiblemente de  $3 \pm 1$  mg/ml. La presencia de NaCl facilita la medición correcta del pH antes de la adsorción de los antígenos.

### 45 **Métodos de tratamiento y Administración de la vacuna**

50 La invención implica la co-administración de antígenos de diferentes patógenos. Estos antígenos son co-administrados por separado a un paciente (por ejemplo en sitios diferentes), pero sustancialmente al mismo tiempo entre sí, por ejemplo, durante la misma consulta con un médico u otro proveedor de cuidado de la salud. La administración de diferentes vacunas conjugadas simultáneamente pero en sitios diferentes puede evitar efectos de supresión potenciales vistos cuando los conjugados comparten una proteína portadora.

65

Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y la invención proporciona un método de promover una respuesta inmune en un paciente, comprendiendo el paso de administrar una composición de la invención al paciente.

5 Los pacientes preferidos para recibir las composiciones de la invención son de menos de 2 años, preferiblemente de entre 0-12 meses de edad. Un grupo particular de pacientes es de entre 1 y 3 meses de edad, y no ha recibido previamente una vacuna conjugada meningocócica. Otro grupo de pacientes es de entre 3 y 5 meses de edad y ha recibido previamente una inmunización de toxoide de difteria.

10 Para tener una eficacia completa, un programa de inmunización primario típico para un niño puede implicar administrar más de una dosis. Por ejemplo, las dosis pueden ser a: 0, 2 y 4 meses (el momento 0 siendo la primera dosis); 0, 1 y 2 meses; 0 y 2 meses; 0, 2 y 8 meses; etc. La primera dosis (momento 0) puede ser administrada a alrededor de 2 meses de edad, o algunas veces (por ejemplo, en un programa de 0-2-8 meses) en torno a 3 meses de edad.

15 Las composiciones pueden ser también usadas como dosis de refuerzo, por ejemplo para niños, en el segundo año de vida.

20 Las composiciones de la invención pueden ser administradas por inyección intramuscular, por ejemplo en el brazo, pierna o nalga. En donde se usa administración separada, como en el presente caso, es típico el inyectar composiciones en extremidades opuestas, por ejemplo inyectar tanto en el brazo izquierdo como el derecho.

25 Donde las composiciones de la invención incluyen un adyuvante basado en aluminio, puede tener lugar durante el almacenamiento el asentamiento de los componentes. La composición debe ser por lo tanto acudida antes de la administración a un paciente. La composición agitada será generalmente una suspensión blanca turbida.

#### ***Envasado de las composiciones de la invención***

30 Las composiciones de la invención pueden ser colocadas en contenedores para su uso. Los contenedores adecuados incluyen frascos y jeringuillas desechables (preferiblemente estériles).

35 Cuando una composición de la invención es envasada en frascos, estos están hechos preferiblemente de material de cristal o plástico. El frasco es preferiblemente esterilizado antes de que se le añada la composición. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los frascos son preferiblemente sellados con un tapón libre de látex. El frasco puede incluir una única dosis de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un 'frasco multidosis'), por ejemplo 10 dosis. Cuando se usa un frasco multidosis, cada dosis deberá ser extraída con una aguja y jeringuilla estériles bajo condiciones asépticas estrictas, teniendo cuidado de evitar contaminar los contenidos del frasco. Los frascos preferidos están hechos de cristal incoloro.

40 Un frasco puede tener una tapa (por ejemplo un cierre Luer) adaptado de tal forma que una jeringuilla prellenada pueda ser insertada en la tapa, los contenidos de la jeringuilla pueden ser expulsados al frasco (por ejemplo para reconstituir el material liofilizado en el mismo) y los contenidos del frasco pueden ser retirados de nuevo a la jeringuilla. Después de la retirada de la jeringuilla del frasco, se puede unir entonces una aguja y la composición puede ser administrada a un paciente. La tapa está preferiblemente localizada dentro de un sello o cobertura, de tal forma que el sello o cobertura tiene que ser removida antes de que se pueda acceder a la tapa.

45 Cuando la composición está envasada en una jeringuilla, la jeringuilla tendrá normalmente una aguja unida a ella, aunque se puede suministrar una aguja separada con la jeringuilla para el montaje y el uso. Se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 1-pulgada calibre 23, 1 pulgada calibre 25 y 5/8 de pulgada calibre 25. Las jeringuillas se pueden proporcionar con etiquetas despegables en la que se pueden imprimir el número de lote y la fecha de caducidad de los contenidos, para facilitar el mantenimiento de un registro. El émbolo en la jeringuilla tiene preferiblemente un tope para evitar que el émbolo sea retirado accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener una tapa y/o émbolo de goma de látex. Las jeringuillas desechables contienen una única dosis de vacuna. La jeringuilla tendrá generalmente una tapa en la punta para sellar la punta antes de su unión a una aguja, y la tapa de la punta está preferiblemente hecha de goma de butilo. Si la jeringuilla y la aguja son envasadas de forma separada, entonces la aguja está preferiblemente equipada con un escudo de goma de butilo. Se prefiere la goma de butilo gris. Las jeringuillas preferidas son las comercializadas bajo el nombre comercial "Tip-Lok"™.

60 Cuando se usa un contenedor de cristal (por ejemplo una jeringuilla o un frasco, se prefiere usar un contenedor hecho de un cristal de borosilicato en lugar de uno de cristal sódico-cálcico.

65 El kit de la invención comprende composiciones inmunogénicas separadas, y estas composiciones se administran por separado (por ejemplo en sitios diferentes), pero sustancialmente al mismo tiempo. Cuando las composiciones se han de mezclar, se prefiere que al menos una de ellas esté inicialmente en forma acuosa y una esté inicialmente en forma liofilizada, de tal forma que la composición liofilizada sea reactivada por la composición

acuosa en el momento del uso. Cuando hay presente un componente liofilizado, comprenderá típicamente uno o más antígenos sacáridos conjugados.

5 Las composiciones para la inclusión separada en kits de la invención incluyen: una composición que comprende un antígeno conjugado de MenC; una composición que comprende un antígeno conjugado neumocócico; una composición que incluye antígeno(s) de *B.pertussis* acelular(es) y un antígeno de poliovirus inactivado; y una composición que incluye un conjugado de Hib.

10 La composición que incluye antígeno(s) de *B.pertussis* acelular(es) también incluye un toxoide de difteria y un toxoide de tétano. También incluye un HbsAg y un IPV. Por lo tanto una composición del kit podría ser una composición D-T-Pa-HBsAg-IPV pentavalente, o un componente D-T-Pa-HBsAG-IPV-Hib líquido completo.

15 Cada composición en el kit puede ser almacenada por separado, por ejemplo en un frasco o jeringuilla separado. También es posible suministrar una composición en una jeringuilla y las otras en frascos. Cuando los componentes son para ser mezclados extemporáneamente en el momento del uso, una disposición alternativa para tener contenedores separados es usar un contenedor multi-cámara. Una jeringuilla multi-cámara permite que las composiciones individuales sean mantenidas de forma separada durante el almacenamiento, pero se mezclen a medida que el émbolo de la jeringuilla es activado.

## 20 **Programas de inmunización**

25 Como se ha mencionado anteriormente un programa de inmunización primario típico para un niño implica administrar más de una dosis. Por ejemplo, las dosis pueden ser a: 0, 2 y 4 meses (el momento 0 siendo la primera dosis); 0, 1 y 2 meses; 0 y 2 meses, etc. La primera dosis (momento 0) es habitualmente a alrededor de 2 meses de edad.

30 Se ha descubierto que un programa de 2 dosis (por ejemplo cada dos meses) no es inferior a un programa de 3 dosis más caro (por ejemplo separación de 1 mes). Las vacunas no meningocócicas normales se pueden dar entre las 2 dosis del programa de 2 dosis.

35 Un método de tratar un paciente que ha recibido previamente (i) una única dosis de un sacárido capsular del serogrupo C de la *N.meningitidis* y (ii) más de una dosis de uno o más de un antígeno de *B.pertussis* acelular, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y/o poliovirus inactivado, puede comprender administrar al paciente una dosis adicional de un sacárido capsular del serogrupo C de la *N.meningitidis*. La dosis de MenC adicional puede ser co-administrada con otros antígenos como se ha descrito anteriormente.

40 Un método para desarrollar una respuesta inmune en un paciente, puede comprender los pasos de: (i) co-administrar al paciente un sacárido capsular del serogrupo C de la *N.meningitidis* y uno o más de un antígeno de la *B.pertussis* acelular, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y/o poliovirus inactivado; después (ii) administrar al paciente uno o más de un antígeno de la *B.pertussis* acelular, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y/o poliovirus inactivado, sin co-administrar un sacárido capsular del serogrupo C de la *N.meningitidis*; y (iii) co-administrar al paciente un sacárido capsular del serogrupo C de la *N.meningitidis* y uno o más de un antígeno de *B.pertussis* acelular, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y/o poliovirus inactivado. Los pasos (i), (ii) y (iii) se realizan preferiblemente en secuencia a intervalos de al menos un mes. Pueden ser realizados a alrededor de 2 meses de edad, a alrededor de 3 meses y a alrededor de 4 meses. El método puede convenientemente ser implantado por la administración de: (i) una primera vacuna y una segunda vacuna; (ii) la segunda vacuna pero no la primera vacuna; y (iii) la primera vacuna y la segunda vacuna.

50 En un programa alternativo, los pasos (ii) y (iii) pueden ser invertidos, es decir un paciente recibe la vacuna del serogrupo C en la primera y segunda visitas, pero no en la tercera visita.

### **General**

55 El término "comprende" abarca "incluye" así como "consiste", por ejemplo "comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

60 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando es necesario, la palabra "sustancialmente" puede ser omitida de la definición de la invención.

El término "alrededor" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo  $x \pm 10\%$ .

65 A menos que se afirme específicamente, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. Por lo tanto los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes se pueden combinar dos componentes entre sí, y después la combinación puede ser combinada por el tercer componente, etc.

Cuando un antígeno se describe como estando "adsorbido" a un adyuvante, se prefiere que al menos el 50% (por peso) del antígeno esté adsorbido, por ejemplo 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más. Se prefiere que el toxoide de difteria y el toxoide de tétano estén ambos totalmente adsorbidos, es decir, ninguno es detectable en el sobrenadante. También se prefiere la adsorción total del HBsAg.

5 Las cantidades de conjugados son generalmente dadas en términos de masa de sacárido (es decir la dosis del conjugado (portador + sacárido) en su conjunto es más alta que la dosis indicada) para evitar la variación debida a la elección del portador.

10 Las proteínas portadoras típicas para el uso en conjugados son las toxinas bacterianas, como la toxina de la difteria [por ejemplo, ver capítulo 13 de la referencia 1; referencias 26-65] (o su mutante CRM197 [66-69]) y la toxina del tétano, habitualmente en forma toxoide (por ejemplo obtenido por tratamiento con un agente químico inactivante, como la formalina o el formaldehído). Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, proteína de la membrana exterior de la *N.meningitidis* [70], péptidos sintéticos [71, 72], proteínas de choque térmico [73, 74], proteínas de tosferina [75, 76], citocinas [77], linfocinas [77], hormonas [77], factores de crecimiento [77], proteínas artificiales comprendiendo epítomos de células CD4<sup>+</sup>T humanas múltiples de varios antígenos derivados de patógenos [78] como el N19 [79], la proteína D de la *H.influenzae* [80-82], neumolisina [83] proteína de superficie neumocócica PspA [84], proteínas de captación de hierro [85], toxina A o B de la *C.difficile* [86], etc.

20 Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben ser obtenidos de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSEs), en particular libres de encefalopatía espongiiforme bovina (BSE).

## 25 MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Se entenderá que la invención se describirá a modo de ejemplo solamente, y que se pueden hacer modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito de la invención.

### 30 *Tres dosis a los 2, 4 & 6 meses*

Se diseñó un estudio para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna MENJUGATE™ (sacárido capsular del serogrupo C meningocócico conjugado) cuando se da junto con la vacuna PREVNAR™ (sacárido capsular neumocócico 7-valente conjugado) y/o el producto INFANRIX-HEXA™ (D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib).

35 Se asignaron 992 bebés, de 2 meses de edad en el momento del reclutamiento, a uno de los tres grupos de vacunación, recibiendo: (1) PREVNAR™ más INFANRIX-HEXA™; (2) MENJUGATE™ más INFANRIX-HEXA™; o (3) MENJUGADO™ más PREVNAR™ más INFANRIX-HEXA™. Las vacunas se administraron concomitantemente, pero en sitios de inyección separados. El estudio se realizó, con las vacunas siendo administradas a las edades de 40 2, 4 y 6 meses.

45 El eritema local, la induración y la hinchazón fueron ligeramente inferiores en el grupo 3 que en el grupo 2 (típicamente alrededor de un 5% menos de reacciones); la sensibilidad fue la misma en ambos grupos. Las reacciones sistémicas fueron similares en todos los grupos, pero fueron típicamente menores en el grupo 2, aunque la diarrea fue inferior en el grupo 3. En todos los casos, sin embargo, las vacunas fueron bien toleradas y fueron seguras.

50 Para evaluar la inmunogenicidad, se midieron títulos bactericidas (BCA) contra MenC en dos muestras sanguíneas de cada sujeto: la primera se tomó en el momento de la primera dosis de vacuna; la segunda se tomó 4-6 semanas después de la tercera dosis. El ensayo BCA usó complemento humano.

55 Los resultados inmunológicos del estudio eran inciertos, porque Buttery y otros [11] habían informado anteriormente que los conjugados del serogrupo C meningocócicos eran inmunológicamente incompatibles con los conjugados multivalentes neumocócicos. Por el contrario, sin embargo, el estudio de la presente invención mostró que el 100% de los sujetos en los grupos (2) y (3) alcanzaron un título bactericida protector (es decir, un aumento de títulos BCA de  $\geq 1:8$  en las dos muestras sanguíneas) contra el serogrupo C de la *N.meningitidis*. Además las GMTs entre los grupos fueron prácticamente idénticas, mostrando que ninguno de los varios componentes de la vacuna no de MenC interfiere con la inmunogenicidad del conjugado de MenC.

60 Los resultados del BCA fueron como sigue:

| Grupo de la vacuna                            | 2              | 3              | Diferencia / Proporción |
|---|----------------|----------------|-------------------------|
| % con $\geq 1:8$ de incremento en GMTs de BCA | 100% (98-100%) | 100% (99-100%) | 0% (-1%-2%)             |
| GMT del BCA en la segunda muestra             | 572 (473-690)  | 565 (465-686)  | 0.99 (0.75-1.3)         |

La inmunogenicidad de los componentes del INFANRIX HEXA™ no se vio afectada. Los títulos de anticuerpos en la segunda muestra sanguínea contra D, T, P, Hib y HBsAg se midieron por ELISA. Los títulos de anticuerpos contra el poliovirus se midieron por la prueba de neutralización estándar. Los resultados fueron como sigue:

5

| Antígeno          | Criterio                  | Grupo 3         | Grupo 2 | Diferencia |
|-------------------|---------------------------|-----------------|---------|------------|
| Difteria          | $\geq 0.1$ IU/mL          | 100%            | 100%    | 0%         |
| Tétano            | $\geq 0.1$ IU/mL          | 100%            | 100%    | 0%         |
| Tosferina         | $\geq$ aumento de 4 veces | 87%             | 89%     | -2%        |
| Hib               | $\geq 0.15$ mg/mL         | 96 <sup>^</sup> | 99%     | -3%        |
| HBsAg             | $\geq 10$ mIU/mL          | 99%             | 99%     | 0%         |
| Poliovirus tipo 1 | $\geq 1:8$                | 99%             | 100%    | 0%         |
| Poliovirus tipo 2 | $\geq 1:8$                | 100%            | 100%    | 0%         |
| Poliovirus tipo 3 | $\geq 1:8$                | 99%             | 100%    | 0%         |

| Antígeno          | Criterio                     | Grupo 1 | Grupo 2 | Diferencia |
|-------------------|------------------------------|---------|---------|------------|
| Difteria          | $\geq 0.1$ IU/mL             | 100%    | 100%    | 0%         |
| Tétano            | $\geq 0.1$ IU/mL             | 100%    | 100%    | 0%         |
| Tosferina         | $\geq$ incremento de 4 veces | 92%     | 89%     | -3%        |
| Hib               | $\geq 0.15$ mg/mL            | 98%     | 99%     | 0%         |
| HBsAg             | $\geq 10$ mIU/mL             | 98%     | 99%     | 2%         |
| Poliovirus tipo 1 | $\geq 1:8$                   | 99%     | 100%    | 1%         |
| Poliovirus tipo 2 | $\geq 1:8$                   | 100%    | 100%    | 0%         |
| Poliovirus tipo 3 | $\geq 1:8$                   | 99%     | 100%    | 1 %        |

La inmunogenicidad de los componentes de PREVNAR™ no se vio afectada significativamente. Los porcentajes de pacientes con títulos ELISA  $\geq 0.15$   $\mu$ g/mL en la segunda muestra sanguínea fueron como sigue:

| Serotipo | Grupo 3 | Grupo 1 | Diferencia |
|----------|---------|---------|------------|
| 4        | 95%     | 96%     | 0%         |
| 6B       | 91%     | 92%     | -1%        |
| 14       | 94%     | 96%     | -2%        |
| 9V       | 95%     | 97%     | -2%        |
| 18C      | 96%     | 94%     | -3%        |
| 19F      | 94%     | 97%     | -3%        |
| 23F      | 91%     | 95%     | -3%        |

Por lo tanto la respuesta inmune contra el sacárido de MenC no fue inferior en los grupos (2) y (3) en comparación con el grupo (1). La respuesta inmune contra los antígenos hexavalentes fue similar en los tres grupos. Por lo tanto la respuesta inmune contra el sacárido neumocócico no fue inferior en el grupo (3) en comparación con el grupo (1). Estos resultados son consistentes con la referencia 3.

#### **Comparación de programas de 2 dosis y de 3 dosis**

El INFANRIX-HEXA™ puede ser administrado de acuerdo a un programa primario de 3 dosis a los 2, 3 y 4 meses de edad. Como las vacunas conjugadas pueden ser inhibidas por la co-administración con antígenos de tosferina acelulares, se diseñó un estudio para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna MENJUGATE™ cuando se da junto con el producto INFANRIX-HEXA™ con este programa de 3 dosis. El conjugado meningocócico fue o co-administrado con las tres dosis hexavalentes (es decir a los 2, 3 y 4 meses de edad) o fue administrada sólo con la primera y la tercera (es decir a los 2 y 4 meses). Las respuestas de memoria contra el conjugado meningocócico se evaluaron administrando una mezcla no conjugada de los sacáridos de los serogrupos A y C a la edad de 12 meses, al mismo tiempo que una dosis adicional de INFANRIX-HEXA™, con la sangre siendo extraída 7 ó 28 días después.

Se asignaron 241 bebés, de 7-11 semanas de edad en el reclutamiento, a uno de los cuatro grupos de vacunación, recibiendo: (1) MENJUGATE™ más INFANRIX-HEXA™ de acuerdo con el programa de 3 dosis, seguido por A/C no conjugado e INFANRIX-HEXA™ a los 12 meses, con extracción sanguínea 1 semana después; (2) lo mismo que el grupo (1) pero con extracción sanguínea 28 días después del A/C no conjugado; (·) MENJUGATE™ más INFANRIX-HEXA™ de acuerdo con el programa de 2 dosis, con el INFANRIX-HEXA™ siendo también administrado a los 3 meses de edad, seguido por A/C no conjugado e INFANRIX-HEXA™ a los 12 meses, con extracción sanguínea 1 semana después; (4) lo mismo que el grupo (3) pero con extracción sanguínea 28 días después del A/C no conjugado. Cuando se administró más de una dosis al mismo tiempo, fueron administradas concomitantemente pero en sitios de inyección separados.

No se observó diferencia clínicamente relevante en la reactogenicidad local entre los grupos y vacunas del tratamiento. Después de la vacunación del MenPS A/C y la cuarta inyección de la vacuna hexavalente a los 12 meses, proporciones más altas de sujetos en cada grupo experimentaron reacciones locales en comparación a después de la primera, segunda y tercera inyección con cualquiera de la vacuna hexavalente o el Menjugate™. La mayoría de las reacciones locales tuvieron lugar en el plazo de dos días posteriores a la inyección y se calificaron como leves o moderadas. Ningún sujeto informó de una reacción local severa al conjugado meningocócico.

La incidencia de las reacciones sistémicas solicitadas, cuando se sumó para todas las inyecciones, fue similar entre los cuatro grupos de tratamiento. En la visita 2, que permitió comparar las reacciones sistémicas después de la co-administración del Menjugate™ con la vacuna hexavalente (grupos 1 y 2) a las reacciones después de sólo la vacuna hexavalente (grupos 3 y 4), no se observó diferencia clínicamente relevante. La mayoría de las reacciones sistémicas tuvieron lugar entre las 6 horas y los 2 días posteriores a la inyección. Ningún sujeto experimentó temperatura rectal  $\geq 40.5^{\circ}$  C.

Un mes después de la inmunización primaria con Menjugate™, el porcentaje de vacunas que mostraban títulos SBA protectores (título $\geq 8$ ) fue del 98% y del 100% para los programas de inmunización de 2 dosis y 3 dosis respectivamente. Los títulos SBA protectores persistieron en el 89% (grupo de 2 dosis), frente al 95% (grupo de 3 dosis) a los 8 meses después de la vacunación. Ambos programas de inmunización indujeron un aumento de más de 100 veces en los títulos medios geométricos SBA medidos un mes después de las inmunizaciones 2 ó 3.

En el momento de una única dosis de desafío de MenPS A/C, los sujetos estimulados con cualquiera de los programas de inmunización del Menjugate™, mostraron un incremento de 15 veces o más de las GMTs SBA en comparación con el pre-desafío. Esto se compara con un aumento de 1,09 veces observado cuando se administró

una única dosis de MenPS A/C en bebés de 12 meses de edad no estimulados en un grupo de control histórico de un estudio previo. El SBA determinó 28 días después del desafío con MenPS A/C las GMTs (grupos 2 y 4) tendían a ser más altas en comparación con las determinadas en el día 7 (grupos 1 y 3).

5 Por lo tanto la reactogenicidad y otros perfiles de seguridad fueron similares entre los cuatro grupos de vacunación.

10 Las GMCs de la línea de base de los anticuerpos contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B fueron similares en sujetos en los grupos de los programas de 2 dosis y 3 dosis (8.61 IU/l y 5.93 IU/l). Al de un mes después de las inmunizaciones primarias, estas habían aumentado 52 veces y 96 veces respectivamente, y había concentraciones de anticuerpos protectores de  $\geq 10$  IU/l presentes en el 99% de los sujetos de cada grupo.

15 Por lo tanto dos inyecciones de conjugado meningocócico, administradas a los 2 y 4 meses de edad, estimularon el sistema inmune para memoria inmunológica en bebés sanos. El 98% de los sujetos en los grupos de 2 dosis y el 100% de los sujetos en el grupo de 3 dosis alcanzaron un título hBCA de  $\geq 1:8$ . La respuesta inmune inducida por el programa de 2 dosis puede ser considerado como no inferior al inducido por el programa de 3 dosis. EL 99% de todos los sujetos desarrollaron títulos  $\geq 10$  IU/l en respuesta al componente de la hepatitis B de la vacunación hexavalente, demostrando así no interferencia con o el programa meningocócico de 2 dosis o el de 3 dosis.

20 En conclusión, un programa de 2 dosis de conjugado meningocócico, cada dos meses en bebés por debajo de 1 año de edad, fue inmunogénica e indujo memoria inmunológica cuando se da junto con la vacuna hexavalente. El programa de inmunización de 2 dosis para el MenC no es inferior al programa de 3 dosis. No hay evidencia de una inmunogenicidad reducida de los antígenos D, T, aP, IPV, HBV o Hib co-administrados.

25 Se puede dar una dosis de refuerzo de conjugado meningocócico a estos pacientes en el segundo año de vida.

### 30 ***Inmunización de D-T-aP-HBV-Hib-MenC 7-valente a bebés***

35 En apoyo de los resultados descritos anteriormente, la referencia 87 informa de un estudio del uso concurrente de vacuna conjugada meningocócica C (NEISVAC-C™), con un portador de toxoide de tétano) con combinaciones basadas en DTaP, de acuerdo con dos programas de vacunación, uno de los cuales incluía vacunación contra la hepatitis B al nacimiento. Se asignaron al azar bebés sanos para recibir o (i) D-T-aP-HBV-IPV/Hib (INFANRIX HEXA™) a los 2, 4 y 6 meses o (ii) HBV al nacimiento seguido por INFANRIX HEXA™ a los 2 y 6 meses pero D-T-aP-IPV-Hib a los 4 meses. En ambos grupos, se co-administraron dos dosis de conjugado MenC-TT a los 2 y 6 meses, y se compararon con 3 dosis de conjugado MenC-CRM197 (MENINGITEC™) co-administradas a los 2, 4, y 6 meses con INFANRIX HEXA™.

40 Todos los recipientes de NEISVAC-C™ tenían concentraciones seroprotectoras de anticuerpos anti-PRP 1 mes después de la tercera dosis de vacuna y todos tenían títulos SBA-MenC  $\geq 1:8$  después de la segunda dosis de NEISVAC-C™. Estas respuestas no fueron inferiores a las vistas después de 3 dosis de DTaP-HBV-IPV/Hib y MENINGITEC™. Las GMCs de los anticuerpos anti-PRP fueron significativamente más altas en las vacunas NEISVAC-C™ que en las vacunas MENINGITEC™. Las respuestas inmunes contra todos los otros antígenos co-administrados fueron incólumes, con proporciones de seroprotección/seropositividad de  $\geq 98.1\%$  en las vacunas NEISVAC-C™.

45 Todos los programas fueron bien tolerados, sin diferencias en la reactogenicidad entre los grupos de estudio.

50 Por lo tanto se concluyó la co-administración de D-T-aP-HBV-IPV/Hib o D-T-aP-IPV/Hib con dos dosis de un conjugado de MenC con un portador de toxoide de tétano era segura, bien tolerada e inmunogénico, sin deterioro de la respuesta de los antígenos co-administrados.

### 55 **REFERENCIAS**

- [1] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.  
 [2] Dagan et al. (2004) Infect Immun 72:5383-91.  
 [3] Tejedor et al. (2004) Pediatr Infect Dis J 23:1109-15.  
 60 [4] Halperin et al. (2002) Clin Invest Med 25:243-51.  
 [5] Schmitt et al. (2003) Vaccine 21:3653-62.  
 [6] Shinefield et al. (1999) Pediatr Infect Dis J. 18:757-63.  
 [7] Slack et al. (2001) J Infect Dis. 184:1617-20.  
 [8] Tichmann-Schumann et al. (2005) Pediatr Infect Dis 24:70-77.  
 65 [9] WO02/00249.  
 [10] WO02/080965.

- [11] Buttery et al. (2005) JAMA 293:1751-8.  
 [12] WO99/42130.  
 [13] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.  
 [14] Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-8.  
 5 [15] Lieberman et al. (1996) JAMA 275:1499-503.  
 [16] WO02/058737.  
 [17] WO03/007985.  
 [18] Rennels et al. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.  
 [19] Campbell et al. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.  
 10 [20] Arakere & Frasch (1991) Infect. Immun. 59:4349-4356.  
 [21] Michon et al. (2000) Dev. Biol. 103:151-160.  
 [22] Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141:4357-4362.  
 [23] W02005/033148.  
 [24] W.H.O. Tech. Rep. Ser. 594:51, 1976.  
 15 [25] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.  
 [26] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.  
 [27] Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.  
 [28] Zielen et al. (2000) Infect. Immun. 68:1435-1440.  
 [29] Darkes & Plosker (2002) Paediatr Drugs 4:609-630.  
 20 [30] WO98/51339.  
 [31] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.  
 [32] Module 6 of WHO's The immunological basis for immunization series (Robertson)  
 [33] Sesardic et al. (2001) Biologicals 29:107-22.  
 [34] NIBSC code: 98/560.  
 25 [35] Module 1 of WHO's The immunological basis for immunization series (Galazka).  
 [36] NIBSC code: 69/017.  
 [37] NIBSC code: DIFT.  
 [38] Sesardic et al. (2002) Biologicals 30:49-68.  
 [39] NIBSC code: 98/552.  
 30 [40] NIBSC code: TEFT.  
 [41] Vanlandschoot et al. (2005) J Gen Virol 86:323-31.  
 [42] European patent 0460716; US patent 5349059.  
 [43] Crabeel et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 78:5026-30.  
 [44] Cabezón et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:6594-8.  
 35 [45] van der Straten et al. (1986) DNA 5:129-36.  
 [46] Harford et al. (1987) Postgraduate Medical Journal 63(suppl 2):65-70.  
 [47] WO03/066094.  
 [48] WO93/24148.  
 [49] Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251) :195-196.  
 40 [50] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.  
 [51] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.  
 [52] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.  
 [53] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.  
 [54] European patent 0477508.  
 45 [55] US patent 5,306,492.  
 [56] WO98/42721.  
 [57] Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.  
 [58] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 or 012342335X.  
 [59] WO96/40242.  
 50 [60] Nony et al. (2001) Vaccine 27:3645-51.  
 [61] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).  
 [62] US patent 4,709,017.  
 [63] WO93/25210.  
 55 [64] US patent 5,917,017.  
 [65] WO00/48638.  
 [66] Del Giudice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.  
 [67] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.  
 [68] Anderson (1983) Infect Immun 39(1) :233-238.  
 60 [69] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76(1) :52-59.  
 [70] EP-A-0372501.  
 [71] EP-A-0378881.  
 [72] EP-A-0427347.  
 [73] WO93/17712  
 65 [74] WO94/03208.  
 [75] WO98/58668.

- [76] EP-A-0471177.  
[77] WO91/01146  
[78] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.  
[79] Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72(8) :4884-7.  
5 [80] EP-A-0594610.  
[81] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.  
[82] WO00/56360.  
[83] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.  
10 [84] WO02/091998.  
[85] WO01/72337  
[86] WO00/61761.  
[87] Tejedor et al. (2006) Pediatr Infect Dis J 25:713-20.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTICS GmbH & Co. KG  
<120> VACUNACION MULTIPLE INCLUYENDO MENINGOCOCO DEL SEROGRUPO C  
20 <130> P050743EP  
<150> PCT/IB2006/002861  
<151> 2006-09-01  
25 <150> USSN 60/713, 801  
<151> 2005-09-01  
<150> USSN 60/750, 894  
30 <151> 2005-12-16  
<160> 3  
<170> SeqWin99, versión 1.02  
35 <210> 1  
<211> 226  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
40 <400> 1

ES 2 443 529 T3

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu  
 20 25 30  
 Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys  
 35 40 45  
 Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser  
 50 55 60  
 Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe  
 65 70 75 80  
 Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val  
 85 90 95  
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly  
 100 105 110  
 Ser Thr Thr Thr Asn Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala  
 115 120 125  
 Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp  
 130 135 140  
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu  
 165 170 175  
 Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu  
 180 185 190  
 Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile  
 195 200 205  
 Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val  
 210 215 220  
 Tyr Ile  
 225

- <210> 2
- <211> 1060
- 5 <212> ADN
- <213> *Saccharomyces cerevisiae*
- <400> 2

ES 2 443 529 T3

|            |            |            |             |             |            |      |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| aagcttacca | ggtctcacac | ggaacaccac | taatggacac  | acattcgaaa  | tactttgacc | 60   |
| ctattttcga | ggaccttgtc | accttgagcc | caagagagcc  | aagattttaa  | ttttcctatg | 120  |
| acttgatgca | aattcccaaa | gctaataaca | tgcaagacac  | gtacgggtcaa | gaagacatat | 180  |
| ttgacctctt | aacaggttca | gacgcgactg | cctcatcagt  | aagaccggtt  | gaaaagaact | 240  |
| tacctgaaaa | aaacgaatat | atactagcgt | tgaatggttag | cgtcaacaac  | aagaagttta | 300  |
| ctgacgcgga | ggccaaggca | aaaagattcc | ttgattacgt  | aagggagtta  | gaatcatttt | 360  |
| gaataaaaaa | cacgcttttt | cagttcgagt | ttatcattat  | caatactgcc  | atttcaaaga | 420  |
| atacgtaaat | aattaatagt | agtgattttc | ctaactttat  | ttagtcaaaa  | aattagcctt | 480  |
| ttaattctgc | tgtaaccggt | acatgcccaa | aatagggggc  | gggttacaca  | gaatatataa | 540  |
| catcgtaggt | gtctgggtga | acagtttatt | cctggcatcc  | actaaatata  | atggagcccc | 600  |
| ctttttaagc | tgcatccag  | aaaaaaaaag | aatcccagca  | ccaaaatatt  | gttttcttca | 660  |
| ccaaccatca | gttcataggt | ccattctctt | agcgcaacta  | cagagaacag  | gggcacaaac | 720  |
| aggcaaaaaa | cgggcacaa  | ctcaatggag | tgatgcaacc  | tgctggagt   | aaatgatgac | 780  |
| acaaggcaat | tgaccacgc  | atgtatctat | ctcattttct  | tacaccttct  | attaccttct | 840  |
| gctctctctg | atgtgaaaa  | agctgaaaa  | aaaggttgaa  | accagttccc  | tgaattatt  | 900  |
| cccctacttg | actaataagt | atataaagac | ggtaggtatt  | gattgtaatt  | ctgtaaatct | 960  |
| atctcttaa  | cttcttaaat | tctactttta | tagttagtct  | tttttttagt  | tttaaaacac | 1020 |
| caagaactta | gtttcgaata | aacacacata | aacaacaaa   |             |            | 1060 |

<210> 3

<211> 1063

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

|            |            |            |             |             |            |      |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| aagcttacca | ggtctcacac | ggaacaccac | taatggacac  | acattcgaaa  | tactttgacc | 60   |
| ctattttcga | ggaccttgtc | accttgagcc | caagagagcc  | aagattttaa  | ttttcctatg | 120  |
| acttgatgca | aattcccaaa | gctaataaca | tgcaagacac  | gtacgggtcaa | gaagacatat | 180  |
| ttgacctctt | aacaggttca | gacgcgactg | cctcatcagt  | aagaccggtt  | gaaaagaact | 240  |
| tacctgaaaa | aaacgaatat | atactagcgt | tgaatggttag | cgtcaacaac  | aagaagttta | 300  |
| ctgacgcgga | ggccaaggca | aaaagattcc | ttgattacgt  | aagggagtta  | gaatcatttt | 360  |
| gaataaaaaa | cacgcttttt | cagttcgagt | ttatcattat  | caatactgcc  | atttcaaaga | 420  |
| atacgtaaat | aattaatagt | agtgattttc | ctaactttat  | ttagtcaaaa  | aattagcctt | 480  |
| ttaattctgc | tgtaaccggt | acatgcccaa | aatagggggc  | gggttacaca  | gaatatataa | 540  |
| catcgtaggt | gtctgggtga | acagtttatt | cctggcatcc  | actaaatata  | atggagcccc | 600  |
| ctttttaagc | tgcatccag  | aaaaaaaaag | aatcccagca  | ccaaaatatt  | gttttcttca | 660  |
| ccaaccatca | gttcataggt | ccattctctt | agcgcaacta  | cagagaacag  | gggcacaaac | 720  |
| aggcaaaaaa | cgggcacaa  | ctcaatggag | tgatgcaacc  | tgctggagt   | aaatgatgac | 780  |
| acaaggcaat | tgaccacgc  | atgtatctat | ctcattttct  | tacaccttct  | attaccttct | 840  |
| gctctctctg | atgtgaaaa  | agctgaaaa  | aaaggttgaa  | accagttccc  | tgaattatt  | 900  |
| cccctacttg | actaataagt | atataaagac | ggtaggtatt  | gattgtaatt  | ctgtaaatct | 960  |
| atctcttaa  | cttcttaaat | tctactttta | tagttagtct  | tttttttagt  | tttaaaacac | 1020 |
| caagaactta | gtttcgaata | aacacacata | aacaacaaa   | atg         |            | 1063 |

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit para el uso en un método de desarrollar una respuesta inmune en un paciente, que comprende un primer componente inmunogénico, un segundo componente inmunogénico y un tercer componente para la administración en sitios diferentes en sustancialmente el mismo tiempo, en donde: (a) el primer componente inmunogénico comprende una formulación acuosa de sacáridos capsulares conjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de la *Streptococcus pneumoniae* y un adyuvante de fosfato de aluminio; (b) el segundo componente inmunogénico comprende un sacárido capsular conjugado del serogrupo C de la *Neisseria meningitidis*; (c) al menos uno de los conjugados neumocócicos tiene la misma proteína portadora que el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*, dicha proteína portadora es una toxina bacteriana en forma toxoide, y los conjugados neumocócicos están preparados para ser administrados de forma separada del conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis* a un paciente; y (d) el tercer componente comprende un antígeno de poliovirus inactivado; un toxoide de difteria; un toxoide de tétano; un antígeno de *B.pertussis* acelular; y un antígeno de superficie de la hepatitis B; y en donde el kit incluye un antígeno de Hib conjugado.
- 10 2. El kit para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sacárido capsular del serogrupo C de la *N.meningitidis* es OAc+.
- 15 3. El kit para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el segundo componente no incluye un adyuvante de fosfato de aluminio.
- 20 4. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis* no es adsorbido a un adyuvante de fosfato de aluminio.
- 25 5. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis* es adsorbido a un adyuvante de fosfato de aluminio.
- 30 6. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sacárido capsular del serogrupo C de la *N.meningitidis* está en forma liofilizada.
- 35 7. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B está en forma de partículas incluyendo una matriz lipídica que comprende fosfolípidos, faspatidilinositol y polisorbato 20.
- 40 8. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 45 9. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la misma proteína portadora es un toxoide de tétano.
- 50 10. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la misma proteína portadora es una proteína D de *Haemophilus influenzae*.
- 55 11. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la misma proteína portadora es una CRM197.
- 60 12. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado de *S.pneumoniae* tiene una proporción sacárido: proteína (p/p) de entre 1:10 y 10:1.
- 65 13. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado de *N.meningitidis* tiene una proporción sacárido: proteína (p/p) de entre 1:10 y 10:1.
14. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado de *N.meningitidis* está presente a entre 1 µg y 20 µg (medido como sacárido) por dosis.
15. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado de *S.pneumoniae* está presente a entre 1 µg y 20 µg (medido como sacárido) por dosis.
16. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende 2-fenoxietanol.
17. El kit para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de cualquier sal de aluminio es menor de 3 mg/ml.
18. (a) Una formulación acuosa de sacáridos capsulares conjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de la *Streptococcus pneumoniae*, que comprende un adyuvante de fosfato de aluminio; (b) un sacárido capsular conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*; en donde al menos uno de los conjugados neumocócicos tiene la

- 5 misma proteína portadora que el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis*, dicha proteína portadora es una toxina bacteriana en forma toxoide; y (c) una composición que comprende un antígeno de poliovirus inactivado (IPV); un toxoide de difteria (D); un toxoide de tétano (T); un antígeno de *B.pertussis* acelular (Pa); y un antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) para el uso en un método de inmunizar a un paciente, en donde los conjugados neumocócicos, el conjugado del serogrupo C de la *N.meningitidis* y la composición DTPa-IPV-HBsAg son para la administración separada a un paciente sustancialmente al mismo tiempo.