

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 795**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006 E 06841492 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1968631**

54 Título: **Vacuna**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2015

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT, 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:

BIEMANS, RALPH LEON;
GARCON, NATHALIE MARIE-JOSEPHE;
HERMAND, PHILIPPE VINCENT;
POOLMAN, JAN y
VAN MECHELEN, MARCELLE PAULETTE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 539 795 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a una vacuna mejorada contra *Streptococcus pneumoniae*.

5 **Antecedentes de la Invención**

10 Los niños menores de 2 años no arman una respuesta inmune contra la mayoría de las vacunas de polisacáridos, de forma que ha sido necesario convertir los polisacáridos inmunogénicos mediante conjugación química a un vehículo proteico. Uniendo el polisacárido, un antígeno independiente de T, a una proteína, un antígeno dependiente de T, confiere al polisacárido las propiedades de dependencia de T incluyendo cambio de isotipo, maduración de la afinidad, e inducción de memoria.

15 Sin embargo, puede haber problemas con la administración repetida de conjugados de polisacárido-proteína, o la combinación de conjugados de polisacárido-proteína para formar vacunas multivalentes. Por ejemplo, se ha informado de que se ensayó una vacuna de polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b (PRP) usando el toxoide tetánico (TT) como vehículo proteico, en un intervalo de dosificación con inmunización simultánea con TT (libre) y una vacuna de conjugado polisacárido de neumococos-TT siguiendo un programa de lactantes convencional. Según se aumentó la dosificación de la vacuna de neumococos, disminuyó la respuesta inmune a la parte del polisacárido PRP de la vacuna conjugada Hib, indicando interferencia inmune del polisacárido, posiblemente mediante el uso del mismo vehículo proteico (Dagan y col., Infect Immun. (1998); 66: 2093-2098).

20 Se ha probado que el efecto de la dosificación del vehículo proteico sobre la respuesta humoral contra la propia proteína es multifacético. En lactantes humanos se ha informado de que el aumento de la dosificación de un conjugado de toxoide tetánico tetravalente provocó una respuesta disminuida contra el vehículo tetánico (Dagan y col. supra). El análisis clásico de estos efectos de vacunas de combinación se ha descrito como supresión epitópica inducida por vehículo, que no se comprende del todo, pero se cree que está provocada por una cantidad excesiva de vehículo proteico (Fattom, Vaccine 17: 126 (1999)). Esto parece que provoca la competición por las células Th, de las células B contra el vehículo proteico, y de las células B contra el polisacárido. Si predominan las células B contra el vehículo proteico, no hay suficientes células Th disponibles para proporcionar la ayuda necesaria a las células B específicas contra el polisacárido. Sin embargo, los efectos inmunológicos observados han sido irregulares, aumentando en algunos casos la cantidad total de vehículo proteico la respuesta inmune, y en otros casos disminuyendo la respuesta inmune.

30 Por tanto, quedan dificultades técnicas en la combinación de conjugados de polisacáridos múltiples en una única formulación de vacuna eficaz.

35 *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria gram-positiva responsable de una considerable morbilidad y mortalidad (particularmente en los jóvenes y ancianos), produciendo enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteriemia y meningitis, y enfermedades asociadas con colonización, tales como la otitis media aguda. La proporción de neumonía por neumococos en los Estados Unidos en personas de más de 60 años se estima que es entre 3 y 8 por cada 100.000. En el 20 % de los casos esto conduce a bacteriemia y otras manifestaciones tales como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana al 30 %, incluso con tratamiento antibiótico.

40 El neumococo se encapsula con un polisacárido reticulado químicamente que confiere especificidad de serotipo. Hay 90 serotipos conocidos de neumococos, y la cápsula es el principal determinante de virulencia de los neumococos, ya que la cápsula no solamente protege la superficie interna de las bacterias del complemento, sino que es por sí misma poco inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos independientes de T, y no se pueden procesar o presentar en moléculas MHC para interactuar con células T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmune a través de un mecanismo alternativo que implica el entrecruzamiento de receptores de superficie en células B.

45 Se ha demostrado en varios experimentos que la protección contra enfermedad por neumococos invasiva está correlacionada fuertemente con anticuerpos específicos para la cápsula, y la protección es específica de serotipo.

Streptococcus pneumoniae es la causa más común de la enfermedad bacteriana invasiva y otitis media en lactantes y niños jóvenes. Asimismo, los ancianos montan malas respuestas contra vacunas por neumococos [Roghmann y col., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], de ahí la incidencia aumentada de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

50 Los síndromes clínicos principales causados por *S. pneumoniae* están ampliamente reconocidos y analizados en todos los libros de texto médicos convencionales (Fedson DS, Muscher DM. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4a edición. PhiladelphiaWB Saunders Co, 2004a: 529-588). Por ejemplo, la enfermedad por neumococos invasiva (IPD) se define como cualquier infección en la que se aísle *S. pneumoniae* de la sangre u otro sitio normalmente estéril (Musher DM. Streptococcus pneumoniae. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious diseases (5a ed). Nueva York, Churchill Livingstone, 2001, p2128-2147). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) está reconocida como que abarca varias afecciones (obstrucción de las vías aéreas, bronquitis crónica, bronquiolitis o enfermedad de las vías respiratorias inferiores y enfisema) que a menudo coexisten. Los pacientes padecen exacerbaciones de su afección que habitualmente están asociadas con dificultad para respirar aumentada, y a menudo tienen tos aumentada que puede ser productiva de moco o esputo purulento (Wilson, Eur Respir J 2001 17:995-1007). EPOC se define fisiológicamente por la presencia de obstrucción irreversible o parcialmente reversible de las vías respiratorias en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. Noviembre 1995; 152(5 Pt 2):S77-121). Las exacerbaciones de EPOC a menudo están causadas por infección bacteriana (por ejemplo, neumococos) (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection

in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. Abr 2001;14(2):336-63).

Por tanto, un objeto de la presente invención es desarrollar una formulación mejorada de una vacuna conjugada de polisacárido de múltiples serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.

5 **Breve Descripción de las Figuras**

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

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

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

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

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

Figura 6 Gráfico de barras que muestra títulos de opsono-fagocitosis anti-22F en ratones Balb/c.

Figura 7 Gráfico de barras que compara repuestas de IgG inducidas en ratones C57B1 jóvenes después de la inmunización con vacuna conjugada 13 valente formulada en diferentes adyuvantes.

20 **Figura 8** Gráfico de barras que muestra la eficacia protectora de diferentes combinaciones de vacuna en un modelo de mono de neumonía.

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

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

Descripción de la Invención

La presente invención proporciona una composición inmunogénica para lactantes que comprende una vacuna multivalente contra *Streptococcus pneumoniae* que comprende conjugados de sacárido capsular de diferentes serotipos, donde la composición comprende un conjugado de sacárido 22F, en el que los sacáridos capsulares se conjugan con una proteína vehículo seleccionada independientemente del grupo que consiste en Toxoide Tetánico (TT), Toxoide Diftérico (TD), CRM197, fragmento C de TT, PhtD, fusiones de PhtDE, neumolisina detoxificada y proteína D en la que la composición comprende además conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 23F y en la que la composición inmunogénica comprende al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con PhtD mediante un engarce.

35 Aunque una infección infantil de neumococo del serotipo 22F no es muy común, los inventores creen que la presencia de 22F en una vacuna infantil contra neumococos será ventajosa para inducir inmunidad de la multitud en la población de modo que la aparición de enfermedad grave en los ancianos causada por este serotipo (tal como neumonía y/o enfermedad invasiva por neumococos (IPD) y/o exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)) puede prevenirse o reducirse en la gravedad. Para los propósitos de la presente invención, "inmunizar un huésped humano contra exacerbaciones de EPOC" o "tratamiento o prevención de exacerbaciones de EPOC" o "reducción en la gravedad de exacerbaciones de EPOC" se refiere a una reducción en la incidencia o tasa e exacerbaciones de EPOC (por ejemplo una reducción en la tasa de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 % o más) o una reducción en la gravedad de las exacerbaciones de EPOC como se ha definido anteriormente, por ejemplo en un grupo de pacientes con la composiciones o vacunas de la invención.

45 Por tanto, en una realización, se proporciona un procedimiento para prevenir que un huésped humano anciano tenga una enfermedad por neumococos causada por infección con *Streptococcus pneumoniae* serotipo 22F (o reducir su gravedad) que comprende administrar a un huésped humano lactante (o una población humana lactante) una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o la vacuna de la invención. Un uso de la composición inmunogénica o vacuna de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención o reducción en la gravedad de una enfermedad causada por infección con el serotipo 22F de *Streptococcus pneumoniae* en pacientes humanos ancianos, donde una dosis inmunoprotectora de la composición o vacuna se administra a una ser humano lactante (o población lactante).

50 En una realización la composición inmunogénica comprende conjugados de sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* de los serogrupos 19A y 19F, opcionalmente donde 19A se conjuga con un primer toxoide bacteriano y 19F se conjuga con un segundo toxoide bacteriano.

La expresión sacárido capsular incluye polisacáridos y oligosacáridos capsulares que se pueden obtener del polisacárido capsular. Un oligosacárido contiene al menos 4 restos de azúcar.

La expresión toxoide bacteriano incluye toxinas bacterianas que se inactivan por mutación genética, por tratamiento químico o por conjugación. Los toxoides bacterianos adecuados incluyen toxoide tetánico, toxoide diftérico, toxoide

de pertussis, citolisinas bacterianas o pneumolisina. Se ha descrito que las mutaciones de pneumolisina (Ply) disminuyen la toxicidad de pneumolisina (documentos WO 90/06951, WO 99/03884). De forma similar, se conocen las mutaciones genéticas de la toxina diftérica que disminuyen su toxicidad (véase a continuación). Los análogos genéticamente destoxificados de la toxina diftérica incluyen CRM197 y otros mutantes descritos en los documentos US 4.709.017, US 5.843.711, US 5.601.827 y US 5.917.017. CRM197 es una forma no tóxica de la toxina diftérica, pero es inmunológicamente indistinguible de la toxina diftérica. CRM197 se produce por *C. diphtheriae* infectada por la fase no toxigénica β 197tox- creada por mutagénesis con nitrosoguanidina del corinéfago b toxigénico (Uchida y col Nature New Biology (1971) 233; 8-11). La proteína CRM197 tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica, pero difiere de ella por un único cambio de base en el gen estructural. Esto conduce a un cambio de glicina a glutamina del aminoácido en la posición 52 que hace que el fragmento A sea incapaz de unirse a NAD, y por lo tanto sea no tóxico (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983 p560-564).

El primer y segundo toxoides bacterianos pueden ser iguales o diferentes. Si el primer y el segundo toxoides bacterianos son diferentes, se entiende que tienen una secuencia de aminoácidos diferente.

Por ejemplo, 19A y 19F se pueden conjugar con toxoide tetánico y toxoide tetánico; toxoide diftérico y toxoide diftérico, Crm197 y CRM197, pneumolisina y pneumolisina, toxoide tetánico y toxoide diftérico, toxoide tetánico y CRM197; toxoide tetánico y pneumolisina; toxoide diftérico y toxoide tetánico; toxoide diftérico y CRM197, toxoide diftérico y pneumolisina; CRM197 y toxoide tetánico, CRM197 y toxoide diftérico; CRM197 y pneumolisina; pneumolisina y toxoide tetánico; pneumolisina y toxoide diftérico; o pneumolisina y CRM197 respectivamente.

Además de conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 22F (y opcionalmente 19A y 19F), la composición inmunogénica comprende además conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 23F.

En una realización, además de conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 22F (y opcionalmente 19A y 19F), la composición inmunogénica comprende además conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.

En una realización, además de conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 22F (y opcionalmente 19A y 19F), la composición inmunogénica comprende además conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.

En una realización, además de conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 22F (y opcionalmente 19A y 19F), la composición inmunogénica comprende además conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.

La vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá antígenos de sacáridos capsulares conjugados, en los que los sacáridos se obtienen de al menos diez serotipos de *S. pneumoniae*. La cantidad de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar de 10 serotipos diferentes (o "V", valencias) a 23 serotipos diferentes (23V). En una realización hay 10, 11, 12, 13, 14 o 15 serotipos diferentes. En otra realización de la invención, la vacuna puede comprender sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados y sacáridos de *S. pneumoniae* no conjugados. Preferentemente, la cantidad total de los serotipos de sacáridos es menor o igual a 23. Por ejemplo, la invención puede comprender 10 serotipos conjugados y 13 sacáridos no conjugados. De una manera similar, la vacuna puede comprender 11, 12, 13, 14 o 16 sacáridos conjugados y 12, 11, 10, 9 o 7 sacáridos no conjugados, respectivamente.

En una realización, la vacuna por neumococos multivalente de la invención se seleccionará entre los siguientes serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, aunque se apreciará que se podrían sustituir uno o dos serotipos diferentes, dependiendo de la edad del destinatario que recibe la vacuna y la localización geográfica en la que se administrará la vacuna. Por ejemplo, una vacuna 10 valente puede comprender polisacáridos de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una vacuna 11 valente también puede incluir sacáridos del serotipo 3. Una vacuna pediátrica (lactante) 12 o 13 valente también puede incluir la formulación 10 u 11 valente suplementada con serotipos 6A y 22F, o 19A y 22F, o 22F y 15B, mientras que una vacuna 13 valente para ancianos puede incluir la formulación 11 valente suplementada con serotipos 19A y 22F, 8 y 22F, o 12F y 22F, o 15B y 22F. Una vacuna pediátrica 14 valente puede incluir la formulación 10 valente que se ha descrito anteriormente suplementada con serotipos 3, 6A, 19A y 22F; serotipos 6A, 8, 19A y 22F; serotipos 6A, 12F, 19A y 22F; serotipos 6A, 15B, 19A y 22F; serotipos 3, 8, 19A y 22F; serotipos 3, 12F, 19A y 22F; serotipos 3, 15B, 19A y 22F; serotipos 3, 6A, 8 y 22F; serotipos 3, 6A, 12F y 22F; o serotipos 3, 6A, 15B y 22F.

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

La vacuna de la presente invención puede comprender proteína D (PD) de *Haemophilus influenzae* (véase por ejemplo el documento EP 0594610). *Haemophilus influenzae* es un organismo clave que causa otitis media, y los presentes inventores han demostrado que incluir esta proteína en una vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* proporcionará un nivel de protección contra otitis media relacionada con *Haemophilus influenzae* (referencia de publicación POET). En una realización, la composición de vacuna comprende proteína D. En un aspecto, PD está

presente como un vehículo proteico para uno o más de los sacáridos. En otro aspecto, la proteína D podría estar presente en la composición de vacuna como una proteína libre. En un aspecto adicional, la proteína D está presente como un vehículo proteico y como proteína libre. La proteína D se puede usar como una proteína de longitud completa o como un fragmento (documento WO0056360). En un aspecto adicional, la proteína D está presente como un vehículo proteico para la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los sacáridos se pueden conjugar con la proteína D. En este aspecto, la proteína D también puede estar presente como proteína libre.

La vacuna de la presente invención comprende uno, dos o más tipos de vehículo proteico. Cada tipo de vehículo proteico puede actuar como vehículo para más de un sacárido, pudiendo ser los sacáridos iguales o diferentes. Por ejemplo, los serotipos 3 y 4 se pueden conjugar con el mismo vehículo proteico, con la misma molécula de vehículo proteico o con diferentes moléculas del mismo vehículo proteico. En una realización, dos o más sacáridos diferentes se pueden conjugar con el mismo vehículo proteico, a la misma molécula de vehículo proteico o a diferentes moléculas del mismo vehículo proteico.

Los sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* presentes en la composición inmunogénica de la invención se conjugan con un vehículo proteico seleccionado independientemente del grupo constituido por fusiones de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, PhtD, fusiones de PhtDE (particularmente los descritos en los documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), pneumolisina destoxificada y proteína D.

El vehículo proteico conjugado con uno o más de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* en los conjugados presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención es opcionalmente PhtD o una fusión de PhtDE. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparten un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una secuencia desvelada en el documento WO 00/37105 o en el documento WO 00/39299 (por ejemplo con una secuencia de aminoácidos 1-838 o 21-838 de SEC ID N° 4 del documento WO 00/37105 para PhtD). Por ejemplo, las proteínas de fusión están compuestas de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE de longitud completa o de fragmentos de 2, 3 o 4 de ellas. Los ejemplos de proteínas de fusión son PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B y PhtE/D, en las que las proteínas se entrecruzan con el primero que se ha mencionado en el extremo N-terminal (véase por ejemplo el documento WO01/98334).

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

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

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

Son ejemplos de vehículos proteicos de la divulgación DT (toxoides diftérico), TT (toxoides tetánico) o fragmento C de TT, DT CRM197 (un mutante de DT), otros mutantes puntuales de DT tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida y col J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones descritas en el documento US 4709017 o en el documento US 4950740; mutación de al menos uno o más de los restos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en el documento US 5917017 o en el documento US 6455673; o un fragmento descrito en el documento US 5843711, pneumolisina por neumococos (Kuo y col (1995) Infect Immun 63; 2706-13) incluyendo ply destoxificada de alguna manera, por ejemplo dPLY-GMBS (documento WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo fusiones PhtDE, fusiones PhtBE (documento WO 01/98334 y documento WO 03/54007), (Pht A-E se describen a continuación con más detalle) OMPC (proteína de membrana externa de meningococos - habitualmente

extraída de *N. meningitidis* serogrupo B - documento EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae* - véase, por ejemplo el documento EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos, péptidos sintéticos (documento EP0378881, documento EP0427347), proteínas de choque térmico (documento WO 93/17712, documento WO 94/03208), proteínas pertussis (documento WO 98/58668, documento EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de células T CD4+ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi y col (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tales como proteína N19 (Baraldoi y col (2004) Infect Immun 72; 4884-7), proteína de superficie de neumococos PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761).

Nurkka y col Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11):1008-14, Nov. 2004 describieron una vacuna por neumococos 11 valente con todos los serotipos conjugados con PD. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que la actividad opsonofagocítica se mejoró para anticuerpos inducidos con conjugados que tenían 19F conjugada a DT en comparación con 19F conjugada a PD. Además, los presentes inventores han demostrado que se observa una mayor reactividad cruzada a 19A con 19F conjugada con DT. Por lo tanto, una característica de la composición de la presente invención es que el serotipo 19F se conjuga con un toxoide bacteriano, por ejemplo TT, pneumolisina, DT o CRM 197. En un aspecto, el serotipo 19F se conjuga con DT. Una característica de la invención es también que el serotipo 19A se conjuga con un toxoide bacteriano, por ejemplo TT, pneumolisina, DT o CRM 197. Los restantes serotipos de sacárido de la composición inmunogénica se pueden conjugar todos con uno o más vehículos proteicos que no son DT (es decir, solamente 19F se conjuga con DT), o se pueden dividir entre uno o más vehículos proteicos que no son DT y el propio DT. En una realización, se conjuga 19F con DT o CRM 197 y todos los serotipos restantes se conjugan con PD. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM 197, y los serotipos restantes se dividen entre PD, y TT o DT o CRM 197. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM 197 y no más de un sacárido se conjuga con TT. En un aspecto de esta realización, dicho un sacárido es 18C o 12F. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM 197 y no más de dos sacáridos se conjugan con TT. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM 197, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y DT o CRM 197. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM 197, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y pneumolisina. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM 197, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y CRM 197. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM 197, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT, pneumolisina y opcionalmente PhtD o la proteína de fusión PhtD/E. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM197, 19A se conjuga con pneumolisina o TT y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT, pneumolisina y opcionalmente PhtD o la proteína de fusión PhtD/E. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM197, 19A se conjuga con pneumolisina o TT, un sacárido adicional se conjuga con TT, un sacárido adicional se conjuga con PhtD o PhtD/E y todos los sacáridos adicionales se conjugan con PD. En una realización adicional, se conjuga 19F con DT o CRM197, 19A se conjuga con pneumolisina, un sacárido adicional se conjuga con TT, un sacárido adicional se conjuga con pneumolisina, 2 sacáridos adicionales se conjugan con PhtD o PhtD/E y todos los sacáridos adicionales se conjugan con PD.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende la proteína D de *Haemophilus influenzae*. En esta realización, si PD no es uno de los vehículos proteicos usados para conjugar cualquier sacárido diferente de 19F, por ejemplo, 19F se conjuga con DT, mientras que los otros serotipos se conjugan con uno o más vehículos proteicos diferentes que no son PD, entonces PD se presentará en la composición de vacuna como proteína libre. Si PD es uno de los vehículos proteicos usados para conjugar sacáridos diferentes de 19F, entonces PD puede opcionalmente estar presente en la composición de la vacuna como proteína libre.

El término "sacárido" en esta memoria descriptiva puede indicar polisacáridos u oligosacáridos e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan de bacterias y se pueden ajustar en tamaño hasta cierto grado por procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, el documento EP497524 y el documento EP497525) y preferentemente por microfluidización. Se puede ajustar el tamaño de los polisacáridos para reducir la viscosidad de las muestras de polisacáridos y/o para mejorar la filtrabilidad de productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un bajo número de unidades de repetición (típicamente 5-30 unidades de repetición) y son típicamente polisacáridos hidrolizados.

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

Los inventores también han observado que el centro de la técnica ha sido usar oligosacáridos para facilitar la producción de conjugados. Los inventores han descubierto que usando conjugados de polisacáridos nativos o de tamaño ligeramente ajustado, se pueden conseguir una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tiene una elevada inmunogenicidad que se pueda filtrar, 2) la proporción de polisacárido a proteína en el conjugado se puede alterar de forma que la proporción de polisacárido a proteína (p/p) se pueda aumentar (lo que puede tener un efecto sobre el efecto de supresión del vehículo), 3) conjugados inmunogénicos propensos a hidrólisis se pueden estabilizar por el uso de sacáridos más grandes para la conjugación. El uso de polisacáridos más grandes puede provocar más entrecruzamientos con el vehículo de conjugación y puede reducir la liberación de sacáridos libres del conjugado. Las vacunas conjugadas descritas en la técnica antecedente tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación para mejorar la conjugación. Los presentes inventores han descubierto que las vacunas

conjugadas de sacáridos que mantienen un tamaño mayor de sacáridos pueden proporcionar una buena respuesta inmune contra enfermedad por neumococos.

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

Para los propósitos de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido que no se ha sometido a un procedimiento (por ejemplo, después de la purificación), el propósito del cual es reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido se puede reducir ligeramente en su tamaño durante procedimientos de purificación normales. Dicho sacárido todavía es nativo. Solamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas de ajuste de tamaño, el polisacárido no se consideraría nativo.

Para los propósitos de la invención, "ajustado en el tamaño por un factor de hasta x_2 " significa que el sacárido se somete a un procedimiento que pretende reducir el tamaño del sacárido pero manteniendo un tamaño de más de la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X_3 , x_4 etc. se tiene que interpretar de la misma manera, es decir, el sacárido se somete a un procedimiento que pretende reducir el tamaño del polisacárido pero manteniendo un tamaño de más de un tercio, un cuarto etc. del tamaño del polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados con un vehículo proteico, en el que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados con un vehículo proteico, en la que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* se ajusta en tamaño por un factor de hasta x_2 , x_3 , x_4 , x_5 , x_6 , x_7 , x_8 , x_9 o x_{10} . En una realización de este aspecto, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos se ajustan en el tamaño por un factor de hasta x_2 , x_3 , x_4 , x_5 , x_6 , x_7 , x_8 , x_9 o x_{10} .

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

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

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

En una realización, los sacáridos de *S. pneumoniae* se ajustan en tamaño por escisión mecánica, por ejemplo por microfluidización o sonicación. La microfluidización y sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes lo suficiente para proporcionar un conjugado que se pueda filtrar. El ajuste de tamaño es por un factor no mayor de x_{20} , x_{10} , x_8 , x_6 , x_5 , x_4 , x_3 o x_2 .

En una realización, la composición inmunogénica comprende conjugados de *S. pneumoniae* que están preparados a partir de una mezcla de polisacáridos y sacáridos nativos que tienen el tamaño ajustado por un factor de no más de x_{20} . En un aspecto de esta realización, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos se ajustan en el tamaño por un factor de hasta x_2 , x_3 , x_4 , x_5 o x_6 .

En una realización, los sacáridos de *S. pneumoniae* se conjugan con el vehículo proteico por un engarce, por ejemplo un engarce bifuncional. El engarce es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, teniendo por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos ácido carboxílico reactivos. El engarce tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono.

Un posible engarce es ADH. Otros engarces incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever y col (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), enlaces glucosídicos (documento US4673574, documento US4808700), hexano diamina y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286). En una realización, se usa ADH como engarce para conjugar sacáridos del serotipo 18C. En una realización, se usa ADH como engarce para conjugar el sacárido del serotipo 22F.

Los conjugados de sacáridos presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden preparar por cualquier técnica de acoplamiento conocida. El procedimiento de conjugación se puede basar en la activación del sacárido con tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado por tanto se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (engarce) a un grupo amino en el vehículo proteico. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que se podría acoplar con el vehículo mediante un enlace tioéter obtenido después de la reacción con un vehículo proteico activado por maleimida (por ejemplo usando GMBS) o un vehículo proteico haloacetilado (por ejemplo usando yodoacetimida [por ejemplo, yodoacetimida de etilo HCl] o bromoacetato de *N*-succinimidilo o SIAB, o SIA, o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado por química de CDAP) se acopla

con hexano diamina o ADH y el sacárido derivatizado con amino se conjuga con el vehículo proteico usando carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el vehículo proteico. Dichos conjugados se describen en la solicitud publicada PCT WO 93/15760 Uniformed Services University y los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094.

- 5 Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido *p*-nitrobenzoico, *N*-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en el documento WO 98/42721. La conjugación puede implicar un engarce carbonilo que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (Bethell y col J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn y col J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18) seguido de la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Esto puede implicar la reducción del extremo anomérico a un grupo hidroxilo primario, protección/desprotección opcional de la reacción del grupo hidroxilo primario del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermedio CDI carbamato y acoplar el intermedio CDI carbamato con un grupo amino de una proteína.

10 Los conjugados también se pueden preparar por procedimientos directos de aminación reductora como se describe en el documento US 4365170 (Jennings) y en el documento US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

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

- 20 En una realización, un grupo hidroxilo (preferentemente un grupo hidroxilo activado, por ejemplo un grupo hidroxilo activado para hacer un éster de cianato [por ejemplo con CDAP]) en un sacárido se une con un grupo amino o carboxílico de una proteína directa o indirectamente (a través de un engarce). Cuando hay presente un engarce, un grupo hidroxilo en un sacárido se une preferentemente a un grupo amino de un engarce, por ejemplo usando conjugación con CDAP. Un grupo amino adicional en el engarce (por ejemplo ADH) se puede conjugar con un grupo ácido carboxílico en una proteína, por ejemplo usando química de carbodiimida, por ejemplo usando EDAC. En una realización, el sacárido o los sacáridos capsulares de neumococos se conjugan primero con el engarce antes de que el engarce se conjugue con el vehículo proteico. Como alternativa, el engarce se puede conjugar con el vehículo antes de la conjugación con el sacárido.

También se puede usar una combinación de técnicas, con algunos conjugados de sacárido-proteína preparados por CDAP, y algunos por aminación reductora.

- 30 En general, se pueden usar los siguientes tipos de grupos químicos en un vehículo proteico para acoplamiento/conjugación:

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

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

- 40 C) Sulfhidrilo (por ejemplo mediante cisteína). En una realización, este grupo se une con un sacárido o engarce acetilado con bromo o cloro con química de maleimida. En una realización, este grupo se activa/modifica con bis diazobencidina.

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

- 45 E) Grupo imidazol (por ejemplo mediante histidina). En una realización, este grupo se activa/modifica con bis diazobencidina.

F) Grupo guanidilo (por ejemplo mediante arginina).

G) Grupo indolilo (por ejemplo mediante triptófano).

- 50 En general se pueden usar los siguientes grupos en un sacárido para un acoplamiento: OH, COOH o NH₂. Los grupos aldehído se pueden generar después de diferentes tratamientos conocidos en la técnica tales como: peryodato, hidrólisis ácida, peróxido de hidrógeno, etc.

Enfoques de acoplamiento directo:

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH₂-Prot----> conjugado

Sacárido-aldehído + NH₂-Prot ----> base de Schiff + NaCNBH₃ ----> conjugado

- 55 Sacárido-COOH + NH₂-Prot + EDAC ----> conjugado

Sacárido-NH₂ + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

Enfoques de acoplamiento indirecto mediante espaciador (engarce):

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH₂---NH₂ ----> sacárido ---NH₂ + COOH-Prot + EDAC ---> conjugado

5 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH₂---SH ----> sacárido ---SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de la modificación de grupos amino de la proteína por ejemplo por SPDP) ----> sacárido -S-S-Prot

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH₂---SH ----> sacárido ---SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) ----> conjugado

10 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH₂---SH ----> Sacárido -SH + Prot- haloacetilada ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂---NH₂ ---> sacárido ---NH₂ + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂---SH ----> sacárido ---SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de la modificación de grupos amino de la proteína por ejemplo por SPDP) ----> sacárido -S-S-Prot

15 Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂---SH ----> sacárido ---SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂---SH ----> sacárido -SH + Prot- haloacetilada ----> conjugado

Sacárido -Aldehído + NH₂---NH₂ ----> sacárido ---NH₂ + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Nota: Se puede usar cualquier carbodiimida adecuada en vez de EDAC anterior.

20 En resumen, los tipos de grupos químicos del vehículo proteico que se pueden usar generalmente para el acoplamiento con un sacárido son grupos amino (por ejemplo en restos de lisina), grupos COOH (por ejemplo en restos de ácido aspártico y glutámico) y grupos SH (si son accesibles) (por ejemplo en restos de cisteína).

25 Preferentemente, la proporción de vehículo proteico a sacárido de *S. pneumoniae* está entre 1:5 y 5:1; por ejemplo entre 1:0,5-4:1, 1:1-3,5:1, 1,2:1-3:1, 1,5:1-2,5:1; por ejemplo entre 1:2 y 2,5:1; 1:1 y 2:1 (p/p). En una realización, la mayoría de los conjugados, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los conjugados tienen una proporción de vehículo proteico a sacárido que es mayor de 1:1, por ejemplo 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1 o 1,6:1.

30 En una realización, al menos un sacárido de *S. pneumoniae* se conjuga con un vehículo proteico mediante un engarce usando CDAP y EDAC. Por ejemplo, se puede conjugar 18C o 22F con una proteína mediante un engarce (por ejemplo aquellos con dos grupos hidrazino en sus extremos tal como ADH) usando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Cuando se usa un engarce, se puede usar CDAP para conjugar el sacárido con un engarce y después se puede usar EDAC para conjugar el engarce con una proteína o, como alternativa, se puede usar EDAC primero para conjugar el engarce con la proteína, después de lo cual se puede usar CDAP para conjugar el engarce con el sacárido.

35 En general, la composición inmunogénica de la invención puede comprender una dosis de cada conjugado de sacárido entre 0,1 y 20 µg, 1 y 10 µg o 1 y 3 µg de sacárido.

40 En una realización, la composición inmunogénica de la invención contiene cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* a una dosis entre 1-20 µg; 0,5-10 µg; 0,5- 5 µg o 1-3 µg de sacárido. En una realización, los sacáridos capsulares pueden presentarse a diferentes dosificaciones, por ejemplo algunos sacáridos capsulares pueden presentarse con una dosis de exactamente 1 µg o algunos sacáridos capsulares se pueden presentar con una dosis de exactamente 3 µg. En una realización, los sacáridos de los serotipos 3, 18C y 19F (o 4, 18C y 19F) se presentan a una dosis mayor que otros sacáridos. En un aspecto de esta realización, los serotipos 3, 18C y 19F (o 4, 18C y 19F) se presentan con una dosis de aproximadamente o exactamente 3 µg, mientras que otros sacáridos en la composición inmunogénica se presentan a una dosis de aproximadamente o exactamente 1 µg.

45 "Alrededor de" o "aproximadamente" se define como dentro de aproximadamente el 10 % de la cifra dada para los propósitos de la invención.

50 En una realización, al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* se conjuga directamente con un vehículo proteico (por ejemplo, usando una de las químicas descritas anteriormente). Preferentemente, el al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* se conjuga directamente por CDAP. En una realización, la mayoría de los sacáridos capsulares, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9 o más se unen directamente al vehículo proteico por CDAP (véase el documento WO 95/08348 y el documento WO 96/29094).

55 La composición inmunogénica puede comprender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*, denominadas en este documento proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas se pueden usar como vehículos proteicos, o pueden estar presentes como proteínas libres, o pueden estar presentes como vehículos proteicos y como proteínas libres. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención se exponen en la superficie, al menos durante parte del ciclo vital del neumococo, o son proteínas que se secretan o se liberan por el neumococo. Preferentemente, las proteínas de la invención se seleccionan entre las siguientes categorías, tales como proteínas que tienen un motivo de secuencia señal de Tipo II de LXXC (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia de la tríada de polihistidina (PhtX)), proteínas de unión a colina (CbpX), proteínas que tienen un motivo de secuencia señal de Tipo I (por ejemplo, Sp101), proteínas que tienen un motivo LPXTG (donde X es

cualquier aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130), y toxinas (por ejemplo, Ply). Los ejemplos se prefieren dentro de estas categorías (o motivos) las siguientes proteínas, o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos.

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

La familia Pht (Tríada de Polihistidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente implicadas en la unión a metales o nucleósidos o la actividad enzimática, (3-5) regiones de super-enrollamiento, un extremo N-terminal conservado y un extremo C-terminal heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos ensayadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros *Streptococcus* y en *Neisseria*. En una realización de la invención, la proteína Pht de la invención es PhtD. Sin embargo, se entiende que los términos Pht A, B, D, y E se refieren a proteínas que tienen secuencias desveladas en las siguientes menciones así como variantes de origen natural (y fabricadas) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es al menos un 90 % idéntica a las proteínas de referencia. Preferentemente es al menos un 95 % idéntica o mucho más preferentemente es un 97 % idéntica.

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

La pneumolisina es una toxina multifuncional con unas actividades citolíticas (hemolíticas) y de activación de complemento distintas (Rubins y col., *Am. Respi. Cit Care Med*, 153:1339-1346 (1996)). La toxina no se secreta por los neumococos, sino que se libera después de la lisis de los neumococos bajo la influencia de autolisina. Sus efectos incluyen por ejemplo, la estimulación de la producción de citoquinas inflamatorias por monocitos humanos, la inhibición del movimiento de los cilios en el epitelio respiratorio humano, y la disminución de la actividad bacteriana y la migración de neutrófilos. El efecto más evidente de la pneumolisina es la lisis de los glóbulos rojos, que implica la unión a colesterol. Debido a que es una toxina, necesita que se destoxifique (es decir, que sea no tóxica para un ser humano cuando se proporcione a una dosificación adecuada para la protección) antes de que se pueda administrar *in vivo*. La expresión y la clonación de pneumolisina de tipo silvestre o nativa se conocen en la técnica. Véase por ejemplo Walker y col. (*Infect Immun*, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell y col. (*Biochim Biophys Acta*, 1007:67-72 (1989)) y Mitchell y col. (*NAR*, 18:4010 (1990)). La destoxificación de ply se puede realizar por medios químicos, por ejemplo, sometiéndola a tratamiento con formalina o con glutaraldehído o una combinación de ambos (documento WO 04081515, PCT/EP2005/010258). Dichos procedimientos se conocen bien en la técnica para diversas toxinas. Como alternativa, ply se puede destoxificar genéticamente. Por tanto, la invención abarca derivados de proteínas por neumococos que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutado" se usa en este documento para referirse a una molécula que ha experimentado delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos usando técnicas bien conocidas para mutagénesis dirigida de sitio o cualquier otro procedimiento convencional. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, una proteína ply mutante se puede alterar de forma que sea biológicamente inactiva manteniendo aún sus epítopos inmunogénicos, véase por ejemplo los documentos WO90/06951, Berry y col. (*Infect Immun*, 67:981-985 (1999)) y WO99/03884.

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

En relación a la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), los miembros de esa familia se identificaron en un principio como proteínas de neumococos que se podrían purificar mediante cromatografía de afinidad a colina. Todas las proteínas de unión a colina se unen no covalentemente a restos de fosforilcolina de ácido teicoico de la pared celular y ácido lipoteicoico asociado a membrana. Estructuralmente, tienen varias regiones en común en toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión a colina comprenden una región de extremo N-terminal (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión a colina conservada (C), compuesta de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente una mitad de la proteína. Como se usa en esta solicitud, la expresión "Familia de Proteínas de Unión a Colina (CbpX)" se selecciona entre el grupo constituido por las Proteínas de Unión de Colina identificadas en el documento WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. CbpA se desvela en el documento WO97/41151. CbpD y CbpG se desvelan en el documento WO00/29434.

PspC se desvela en el documento WO97/09994. PbcA se desvela en el documento WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a colina desvelada en el documento WO 98/39450. Preferentemente, las Proteínas de Unión a Colina se seleccionan entre el grupo constituido por CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Otra realización preferida es truncamientos de CbpX en los que "CbpX" se ha definido anteriormente y "truncamientos" se refiere a proteínas CbpX que carecen del 50 % o más de la región de unión a Colina (C). Preferentemente, dichas proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Más preferentemente, dichos truncamientos de proteína carecen de (i) la región de unión de colina y (ii) también una parte de la mitad N-terminal de la proteína, manteniendo aún una región de repetición (R1 o R2). Más preferentemente, el truncamiento tiene 2 regiones de repetición (R1 y R2). Son ejemplos de dichas realizaciones preferidas NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en el documento WO99/51266 o en el documento WO99/51188, sin embargo, también se consideran dentro del ámbito de la presente invención otras proteínas de unión a colina que carecen de una región de unión a colina similar.

La familia LytX son proteínas asociadas a membrana asociadas con lisis celular. El dominio de N-terminal comprende dominio o dominios de unión a colina, sin embargo, la familia LytX no tiene todas las características que se han encontrado en la familia CbpA que se ha indicado anteriormente y por tanto, para la presente invención, la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio de C-terminal contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas LytX. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia LytX, LytA se desvela en Ronda y col., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB se desvela en el documento WO 98/18930, y también se denomina Sp46. LytC también se describe en el documento WO 98/18930, y también se denomina Sp91. Un miembro preferido de esa familia es LytC.

Otra realización preferida es truncamientos de LytX en los que "LytX" se ha definido anteriormente y "truncamientos" se refiere a proteínas LytX que carecen del 50 % o más de la región de unión a colina. Preferentemente, dichas proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Otra realización preferida más de la presente invención es proteínas quiméricas (o fusiones) de truncamientos de CbpX-truncamientos de LytX. Preferentemente, esto comprende NR1xR2 (o R1xR2) de CbpX y la parte de C-terminal (extremo C, es decir, que carecen de los dominios de unión a colina) de LytX (por ejemplo, extremo C LytC o extremo C Sp91). Más preferentemente, CbpX se selecciona entre el grupo constituido por CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Más preferentemente aún, es CbpA. Preferentemente, LytX es LytC (también denominado Sp91). Otra realización de la presente invención es PspA o truncamientos de PsaA que carecen del dominio de unión a colina (C) y se expresa como una proteína de fusión con LytX. Preferentemente, LytX es LytC.

Con respecto a PsaA y PspA, ambas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, PsaA y las variantes de delección transmembrana de la misma se han descrito por Berry y Paton, Infect Immun diciembre 1996; 64(12):5255-62. PspA, y las variantes de delección transmembrana de la misma se han desvelado en, por ejemplo, los documentos US 5804193, WO 92/14488, y WO 99/53940.

Sp128 y Sp130 se desvelan en el documento WO00/76540. Sp125 es un ejemplo de proteína de superficie de neumococos con el motivo LPXTG de Anclaje a la Pared Celular (donde X es cualquier aminoácido). Se ha demostrado que cualquier proteína dentro de esta clase de proteínas de superficie de neumococos con este motivo es útil en el contexto de la presente invención, y por lo tanto se considera una proteína adicional de la invención. La propia Sp125 se describe en el documento WO 98/18930, y también se conoce como ZmpB - una metaloproteínasa de cinc. Sp101 se desvela en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia N° y85993). Se caracteriza por una secuencia señal de Tipo I. Sp133 se desvela en el documento 98/06734 (donde tiene la referencia N° y85992). También se caracteriza por una secuencia señal de Tipo I.

Los ejemplos de antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* preferidos que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) son: OMP106 [documento WO 97/41731 (Antex) y documento WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 o fragmentos del mismo (documento WO 0018910); LbpA y/o LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documento WO 97/13785 y documento WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HasR (documento PCT/EP99/03824); PilQ (documento PCT/EP99/03823); OMP85 (documento PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 9917977.2); lipo10 (documento GB 9918208.1); lipo11 (documento GB 9918302.2); lipo18 (documento GB 9918038.2); P6 (documento PCT/EP99/03038); D15 (documento PCT/EP99/03822); OmpI1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE. Los ejemplos de antígenos no tipificables de *Haemophilus influenzae* o fragmentos de los mismos que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) incluyen: proteína fimbriina [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma [por ejemplo fusiones de péptidos LB1(f); documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (Universidad Estatal de Nueva York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); P2; y P5 (documento WO 94/26304).

Las proteínas de la invención también se pueden combinar de forma beneficiosa. Por combinar se entiende que la composición inmunogénica comprende todas las proteínas de las siguientes combinaciones, como vehículos proteicos o como proteínas libres o como una mezcla de las dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas como se expone en este documento a continuación, ambas proteínas se pueden usar como vehículos proteicos, o ambas proteínas pueden estar presentes como proteínas libres, o ambas pueden estar presentes como un vehículo y como una proteína libre, o una puede estar presente como un vehículo proteico y una proteína libre mientras que la otra está presente solamente como un vehículo proteico o como una proteína libre, o una puede estar presente como un vehículo proteico y la otra como una proteína libre. Cuando se da una combinación de tres proteínas, existen posibilidades similares. Las combinaciones preferidas incluyen, aunque sin limitación, PhtD + NR1xR2, PhtD + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-extremo C de Sp91, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-extremo C de Sp91, PhtA + Ply, PhtA +

Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferentemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Más preferentemente es de CbpA. Otras combinaciones incluyen 3 combinaciones de proteína tales como PhtD + NR1xR2 + Ply, y PhtA + NR1xR2 + PhtD. En una realización, la composición de vacuna comprende pneumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como vehículos proteicos. En una realización adicional, la composición de la vacuna comprende pneumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas libres.

En un aspecto independiente, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos cuatro conjugados de sacárido capsular de *S. pneumoniae* que contienen sacáridos de serotipos de *S. pneumoniae* en los que al menos un sacárido se conjuga con PhtD o proteínas de fusión del mismo y la composición inmunogénica es capaz de provocar una respuesta inmune eficaz contra PhtD.

Una respuesta inmune eficaz contra PhtD o proteínas de fusión de la misma se mide por ejemplo por un ensayo de protección tal como el que se describe en el ejemplo 15. Una respuesta inmune eficaz proporciona al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de supervivencia 7 días después de la exposición a una cepa heteróloga. Dado que la cepa de exposición es heteróloga, la protección producida se debe a la respuesta inmune contra PhtD o proteínas de fusión de la misma.

Como alternativa, una respuesta inmune eficaz contra PhtD se mide por ELISA como se describe en el ejemplo 14. Una respuesta inmune eficaz da una respuesta de IgG anti-PhtD de al menos 250, 300, 350, 400, 500, 550 o 600 µg/ml de GMC.

Por ejemplo, la composición inmunogénica comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* de diferentes serotipos conjugados con PhtD. Por ejemplo, los serotipos 22F y 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 adicionalmente seleccionados de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 23F y 33F se conjugan con PhtD. En una realización, dos o tres serotipos 3, 6A y 22F se conjugan con PhtD.

La composición inmunogénica de la invención comprende al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con PhtD mediante un engarce, por ejemplo ADH. En una realización, se usa uno de los productos químicos de conjugación enumerados a continuación.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con PhtD o proteínas de fusión de la misma, en el que la proporción de PhtD a sacárido en el conjugado está entre 6:1 y 1:5, 6:1 y 2:1, 6:1 y 2.5:1, 6:1 y 3:1, 6:1 y 3.5:1 (p/p) o es mayor de (es decir, que contiene una mayor proporción de PhtD) 2,0:1, 2,5:1, 3,0:1, 3,5:1 o 4,0:1 (p/p).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende pneumolisina.

La presente invención además proporciona una vacuna que contiene las composiciones inmunogénicas de la invención y un excipiente farmacológicamente aceptable.

Las vacunas de la presente invención se pueden potenciar con adyuvante, particularmente cuando se pretenden usar en una población anciana, pero también para usar en poblaciones de lactantes. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como un gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alumbre, pero también pueden ser otras sales metálicas tales como las de calcio, magnesio, hierro o cinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acetilada, o azúcares acetilados, sacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente, o polifosfacenos.

Se prefiere que el adyuvante se seleccione para ser un inductor preferencial de una respuesta de tipo TH1. Dichos niveles elevados de citoquinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de repuestas inmunes mediadas por células contra un antígeno dado, mientras que niveles elevados de citoquinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales contra el antígeno.

La distinción entre la respuesta inmune de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una repuesta inmune que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citoquinas en términos como los que se describen en clones de células T CD4+ de ratones por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se han asociado con la producción de las citoquinas INF-γ e IL-2 por linfocitos T. Otras citoquinas a menudo asociadas directamente con la inducción de repuestas inmunes de tipo Th1 no se producen por células T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Los sistemas de adyuvante adecuados que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen: monofosforil lípido A o un derivado del mismo (o un lípido A destoxificado en general - véase por ejemplo el documento WO2005107798), particularmente monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación véase el documento GB 2220211 A); y una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3 des-O-acilado, junto con una sal de aluminio (por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En dichas combinaciones, el antígeno y 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, permitiendo un suministro más eficaz de señales antigénicas e inmunoestimuladoras. Estudios han demostrado que 3D-MPL es capaz de potenciar adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en alumbre [Thoelen y col. Vaccine (1998) 16:708-14; documento EP 689454-B1].

Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que el QS21 está inactivado con colesterol como se desvela en el documento WO 96/33739. En el documento WO 95/17210 se describe una formulación de adyuvante

particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua. En una realización, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una saponina, que puede ser QS21. La formulación también puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol (documento WO 95/17210).
 5 Oligonucleótidos que contienen CpG no metilado (documento WO 96/02555) y otros oligonucleótidos inmunomoduladores (documento WO0226757 y documento WO03507822) también son inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son adecuados para su uso en la presente invención.

Son adyuvantes particulares los seleccionados entre el grupo constituido por sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas del receptor de tipo Toll (en particular, agonista del receptor 2 de tipo Toll, agonista del receptor 3 de tipo Toll, agonista de receptor 4 de tipo Toll, agonista del receptor 7 de tipo Toll, agonista del receptor 8 de tipo Toll y agonista del receptor 9 de tipo Toll), saponinas o combinaciones de los mismos.
 10

Un adyuvante que se puede usar con las composiciones de vacunas de la invención son preparaciones de ampollas o vesículas de membrana externa de cepas bacterianas gram-negativas tales como las mostradas en el documento WO02/09746 - particularmente ampollas de *N. meningitidis*. Las propiedades de adyuvante de las ampollas se pueden mejorar manteniendo LOS (lipooligosacárido) sobre su superficie (por ejemplo a través de la extracción con concentraciones bajas de detergente [por ejemplo desoxicolato al 0-0,1 %]). Los LOS se pueden destoxificar a través de las mutaciones msbB(-) o htrB(-) analizadas en el documento WO02/09746. Las propiedades adyuvantes también se pueden mejorar manteniendo PorB (y retirando opcionalmente PorA) de ampollas de meningococos. Las propiedades adyuvantes también se pueden mejorar truncando la estructura del sacárido del núcleo externo de LOS en ampollas de meningococos - por ejemplo mediante la mutación lgtB(-) analizada en el documento WO2004/014417. Como alternativa, los LOS mencionados anteriormente (por ejemplo aislados de un cepa msbB(-) y/o lgtB(-)) se pueden purificar y usar como adyuvante en las composiciones de la invención.
 15
 20

Un adyuvante adicional que se puede usar con las composiciones de la invención se puede seleccionar entre el grupo constituido por: una saponina, lípido A o un derivado del mismo, un oligonucleótido inmunoestimulador, un fosfato de alquil glucosaminida, una emulsión de aceite en agua o combinaciones de los mismos. Un adyuvante adicional preferido es una sal metálica en combinación con otro adyuvante. Se prefiere que el adyuvante sea un agonista del receptor de tipo Toll, en particular un agonista de receptor 2, 3, 4, 7, 8 o 9 de tipo Toll, o una saponina, en particular Qs21. Se prefiere adicionalmente que el sistema de adyuvante comprende dos o más adyuvantes de la lista anterior. En particular, las combinaciones contienen preferentemente un adyuvante de saponina (en particular Qs21) y/o un agonista de receptor 9 de tipo Toll tal como oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG. Otras combinaciones preferidas comprenden una saponina (en particular QS21) y un agonista del receptor 4 de tipo Toll tal como monofosforil lípido A o su derivado 3 desacilado, 3 D - MPL, o una saponina (en particular QS21) y un ligando del receptor 4 de tipo Toll tal como un fosfato de alquil glucosaminida.
 25
 30

Los adyuvantes particularmente preferidos son combinaciones de 3D-MPL y QS21 (documento EP 0 671 948 B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documento WO 95/17210, documento WO 98/56414), o 3D-MPL formulado con otros vehículos (documento EP 0 689 454 B1). Otros sistemas de adyuvante preferidos comprenden una combinación de 3 D MPL, QS21 y un oligonucleótido CpG como se describe en el documento US6558670 y en el documento US6544518.
 35

En una realización, el adyuvante es (o comprende) un ligando del receptor 4 de tipo Toll (TLR), preferentemente un agonista tal como un derivado de lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3 D - MPL).
 40

3 D-MPL está disponible en GlaxoSmithKline Biologicals North America y promueve principalmente respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Se puede producir de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Preferentemente en las composiciones de la presente invención se usan 3 D-MPL de partícula pequeña. El 3 D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partículas tal que se puede filtrar a esterilidad a través de un filtro de 0,22 µm. Dichas preparaciones se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/21292. Los derivados sintéticos de lípido A son conocidos, estando algunos descritos como agonistas de TLR-4, e incluyen, aunque sin limitación:
 45

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO 95/14026).
 50

OM294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documento WO99/64301 y documento WO 00/0462)

OM197 MP-Ac DP 10-(6-aminohexanoato) de (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127).
 55

Otros ligandos de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquil glucosaminida (AGP) tales como los descritos en el documento WO9850399 o en el documento US6303347 (también se desvelan procedimientos para la preparación de AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se describe en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Ambos están concebidos para ser útiles como adyuvantes.
 60

Otro inmunoestimulador preferido para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de América del Sur Quillaja Saponaria Molina y se describió por primera vez como que tiene actividad adyuvante por Dalsgaard y col. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, páginas 243-254). Los fragmentos purificados de Quil A se han
 65

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

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

Preferentemente, la saponina se presenta en forma de un liposoma, ISCOM o una emulsión de aceite en agua.

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

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

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen preferentemente enlaces internucleotídicos modificados por fosforotioato.

35 OLIGO 1 (SEC ID N° 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
 OLIGO 2 (SEC ID N° 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
 OLIGO 3 (SEC ID N° 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
 OLIGO 4 (SEC ID N° 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
 OLIGO 5 (SEC ID N° 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
 OLIGO 6 (SEC ID N° 6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

40 Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores que tengan deleciones o adiciones intrascendentes a las mismas.

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

45 El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua o puede comprender una emulsión de aceite en agua en combinación con otros adyuvantes. La fase oleosa del sistema de emulsión comprende preferentemente un aceite metabolizable. El significado de la expresión aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable puede definirse como "que es capaz de transformarse por el metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el destinatario y sea capaz de transformarse por el metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes habituales de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también forman parte de la presente invención y pueden incluir aceites disponibles en el mercado tales como NEOBEE® y otros. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en cantidades más bajas en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levaduras, y es un aceite particularmente preferido para su uso en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis del colesterol (Merck index, 10ª Edición, N° de entrada 8619).

55 Los tocoles (por ejemplo vitamina E) también se usan a menudo en adyuvantes de emulsiones de aceite (documento EP 0 382 271 B1; documento US5667784; documento WO 95/17210). Los tocoles usados en las emulsiones de aceite (preferentemente emulsiones de aceite en agua) de la invención se pueden formular como se describe en el documento EP 0 382 271 B1, en que los tocoles pueden ser dispersiones de gotitas de tocol, opcionalmente comprendiendo un agente emulsionante, de preferentemente menos de 1 micrómetro de diámetro. Como alternativa, los tocoles se pueden usar en combinación con otro aceite, para formar la fase oleosa de una emulsión de aceite. Se describen ejemplos de emulsiones de aceite que se pueden usar en combinación con el tocol en este documento, tal como los aceites metabolizables que se han descrito anteriormente.

65 Se ha sugerido que los adyuvantes de emulsiones de aceite en agua por sí mismos son útiles como composiciones adyuvantes (documento EP 0 399 843B), también combinaciones de aceite en agua y otros agentes activos se han descrito como adyuvantes para vacunas (documento WO 95/17210; documento WO 98/56414; documento WO

99/12565; documento WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsión de aceite, tales como emulsiones de agua en aceite (documento US 5.422.109; documento EP 0 480 982 B2) y emulsiones de agua en aceite en agua (documento US 5.424.067; documento EP 0 480 981 B). Todos forman sistemas de emulsiones de aceite preferidos (en particular cuando incorporan tocoles) para formar adyuvantes y composiciones de la presente invención.

Más preferentemente, la emulsión de aceite (por ejemplo emulsiones de aceite en agua) además comprende un agente emulsionante tal como TWEEN 80 y/o un esteroles tal como colesterol.

Una emulsión de aceite preferida (preferentemente emulsión de aceite en agua) comprende un aceite metabolizable no tóxico, tal como escualeno, escualeno o un tocoferol tal como alfa tocoferol (y preferentemente ambos, escualeno y alfa tocoferol) y opcionalmente un emulsionante (o tensioactivo) tal como Tween 80. También se puede incluir un esteroles (preferentemente colesterol).

El procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua se conoce bien por los especialistas en la técnica. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa que contiene tocol con un tensioactivo tal como una solución de PBS/TWEEN80™, seguido de la homogeneización usando un homogeneizador, será evidente para los especialistas en la técnica que un procedimiento que comprende pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsificación en un microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, un máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una presión máxima de entrada de 0,60 MPa (presión de salida aproximadamente 85,00 MPa)) se podría adaptar por los especialistas en la técnica para producir volúmenes de emulsión menores o mayores. La adaptación se podría conseguir por experimentación de rutina comprendiendo la medición de la emulsión resultante hasta conseguir una preparación con gotitas de aceite del diámetro necesario.

En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el agente emulsionante deben estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

El tamaño de las gotitas de aceite que se encuentran en la emulsión de aceite en agua estable preferentemente son menores de 1 micrómetro, pueden estar en el intervalo de sustancialmente 30-600 nm, preferentemente sustancialmente aproximadamente 30-500 nm de diámetro y más preferentemente sustancialmente 150-500 nm de diámetro, y en particular de aproximadamente 150 nm de diámetro, medido por espectroscopía de correlación de fotones. En este aspecto, el 80 % de las gotitas de aceite en número debe estar dentro de los intervalos preferidos, más preferentemente más del 90 % y mucho más preferentemente más del 95 % de las gotitas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones de aceite de la presente invención están convencionalmente en el intervalo del 0,5-20 % o del 2 al 10 % de aceite (del volumen de dosis total) tal como escualeno; y cuando está presente, alfa tocoferol del 2 al 10 %, y de tensioactivo del 0,3 al 3 %, tal como monooleato de polioxietilensorbitán. Preferentemente la proporción de aceite (preferentemente escualeno):tocol (preferentemente, α -tocopherol) es igual o menor de 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. Un emulsionante, tal como Tween80 o Span 85, también puede estar presente a un nivel de aproximadamente el 1 %. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

Se describen ejemplos de sistemas de emulsión preferidos en los documentos WO 95/17210, WO 99/11241 y WO 99/12565, que describen adyuvantes de emulsiones basados en escualeno, α -tocopherol, y TWEEN 80, opcionalmente formulados con los inmunoestimuladores QS21 y/o 3D-MPL. Por tanto, en una realización particularmente preferida de la presente invención, el adyuvante puede comprender adicionalmente otros inmunoestimuladores, tales como LPS o derivados del mismo, y/o saponinas. Se describen ejemplos de inmunoestimuladores adicionales en este documento y en "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volumen 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

En un aspecto preferido el adyuvante y las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención comprenden una saponina (preferentemente QS21) y/o un derivado de LPS (preferentemente 3D-MPL) en una emulsión de aceite descrita anteriormente, opcionalmente con un esteroles, (preferentemente colesterol). Adicionalmente, la emulsión de aceite (preferentemente emulsión de aceite en agua) puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina. Se describen adyuvantes que comprenden una emulsión de aceite en agua, un esteroles y una saponina en el documento WO 99/12565.

Típicamente para la administración humana, la saponina (preferentemente QS21) y/o derivado de LPS (preferentemente 3D-MPL) estarán presentes en una dosis humana de composición inmunogénica en el intervalo de 1 μ g - 200 μ g, tal como 10-100 μ g, preferentemente 10 μ g - 50 μ g por dosis. Típicamente, la emulsión de aceite (preferentemente emulsión de aceite en agua) comprenderá del 2 al 10 % de aceite metabolizable. Preferentemente comprenderá del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de alfa tocoferol y del 0,3 al 3 % (preferentemente 0,4 - 2 %) de emulsionante (preferentemente tween 80 [monooleato de polioxietilensorbitán]). Cuando están presentes tanto escualeno como alfa tocoferol, preferentemente la proporción de escualeno:alfa tocoferol es igual o menor de 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. También puede estar presente Span 85 (Trioleato de sorbitán) a un nivel del 0,5 al 1 % en las emulsiones usadas en la invención. En algunos casos, puede ser ventajoso que las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador, por ejemplo otros emulsionantes/tensioactivos, incluyendo ácido caprílico (merck index 10ª Edición, número de entrada 1739), de los que Tricaprilina es particularmente preferida.

Cuando se incluyen escualeno y una saponina (preferentemente QS21), es beneficioso incluir también un esteroles (preferentemente colesterol) en la formulación ya que esto permite una reducción en el nivel total de aceite en la emulsión. Esto conduce a un coste reducido de fabricación, mejora de la comodidad global de la vacunación, y también mejoras cualitativas y cuantitativas de las respuestas inmunes resultantes, tal como una producción mejorada de IFN- γ . En consecuencia, el sistema de adyuvante de la presente invención típicamente comprende una proporción de aceite metabolizable:saponina (p/p) en el intervalo de 200:1 a 300:1, aunque la presente invención se puede usar en una forma de "aceite débil" cuyo intervalo preferido es de 1:1 a 200:1, preferentemente 20:1 a 100:1,

y mucho más preferentemente sustancialmente 48:1, esta vacuna mantiene las propiedades de adyuvante beneficiosas de todos los componentes con un perfil de reactividad muy reducido. En consecuencia, las realizaciones particularmente preferidas tienen una proporción de escualeno:QS21 (p/p) en el intervalo de 1:1 a 250:1, también un intervalo preferido es 20:1 a 200:1, preferentemente 20:1 a 100:1, y más preferentemente sustancialmente 48:1. Preferentemente también se incluye un esteroide (más preferentemente colesterol) en una proporción de saponina:esteroide descrita en este documento

Los sistemas de emulsión de la presente invención preferentemente tienen un tamaño pequeño de gotitas de aceite en el intervalo de submicrómetros. Mucho más preferentemente, los tamaños de las gotitas de aceite estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, y mucho más preferentemente de 120-600 nm de diámetro.

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

Los ejemplos de un agonista de TLR 2 incluyen peptidoglicano o lipoproteína. Las imidazoquinolinas, tales como Imiquimod y Resiquimod, son agonistas de TLR7 conocidos. El ARN monocatenario también es un agonista de TLR conocido (TLR8 en seres humanos y TLR7 en ratones), mientras que el ARN bicatenario y poli IC (ácido poliinosínico-policitidílico - un mimético sintético comercial de ARN vírico) son ejemplos de agonistas de TLR 3. El 3D-MPL es un ejemplo de un agonista de TLR4, mientras que CPG es un ejemplo de un agonista de TLR9. La composición inmunogénica puede comprender un antígeno y un inmunoestimulador adsorbido sobre una sal metálica. Las formulaciones de vacuna basadas en aluminio en las que el antígeno y el inmunoestimulador monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL) se adsorben sobre la misma partícula, como se describe en los documentos EP 0 576 478 B1, EP 0 689 454 B1, y EP 0 633 784 B1. En estos casos, el antígeno primero se adsorbe después sobre la sal de aluminio seguido de la adsorción del inmunoestimulador 3D-MPL sobre las mismas partículas de sal de aluminio. Dichos procedimientos implican primero la suspensión de 3D-MPL por sonicación en un baño de agua hasta que las partículas alcanzan un tamaño entre 80 y 500 nm. El antígeno típicamente se adsorbe sobre la sal de aluminio durante una hora a temperatura ambiente con agitación. La suspensión de 3D-MPL después se añade al antígeno adsorbido y la formulación se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se mantiene a 4 °C hasta su uso.

En otro procedimiento, el inmunoestimulador y el antígeno están en partículas metálicas diferentes, como se describe en el documento EP 1126876. El procedimiento mejorado comprende la adsorción del inmunoestimulador sobre una partícula de sal metálica, seguido de la adsorción del antígeno sobre otra partícula de sal metálica, seguido de la mezcla de las partículas metálicas específicas para formar una vacuna. El adyuvante para su uso en la presente invención puede ser una composición adyuvante que comprende un inmunoestimulador adsorbido sobre una partícula de sal metálica, caracterizado porque la partícula de sal metálica está sustancialmente libre de otro antígeno. Además, se proporcionan vacunas por la presente invención se caracterizan porque el inmunoestimulador se adsorbe sobre partículas de sal metálica que están sustancialmente libres de otro antígeno, y porque las partículas de sal metálica que se adsorben al antígeno están sustancialmente libres de otros inmunoestimuladores.

En consecuencia, la presente invención proporciona una formulación adyuvante que comprende un inmunoestimulador que se ha adsorbido sobre una partícula de una sal metálica, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de otro antígeno. Además, esta formulación adyuvante puede ser un intermedio que, si se usa dicho adyuvante, sea necesario para la fabricación de la vacuna. En consecuencia, se proporciona un procedimiento para la fabricación de una vacuna que comprende mezclar una composición de adyuvante que es uno o más inmunoestimuladores adsorbidos sobre una partícula metálica con un antígeno. Preferentemente, el antígeno se ha pre-adsorbido sobre una sal metálica. Dicha sal metálica puede ser idéntica o similar a la sal metálica que se adsorbe sobre el inmunoestimulador. Preferentemente, la sal metálica es una sal de aluminio, por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición de vacuna que comprende un inmunoestimulador adsorbido sobre una primera partícula de una sal metálica, y un antígeno adsorbido sobre una sal metálica, caracterizado por que las primeras y segundas partículas de sal metálica son partículas diferentes.

Los derivados de LPS o LOS o mutaciones o derivados de lípido A descritos en este documento se diseñan para ser menos tóxicos (por ejemplo 3D-MPL) que los lipopolisacáridos nativos y son equivalentes intercambiables respecto a muchos usos de estos restos descritos en este documento. Pueden ser ligandos de TLR4 como se ha descrito anteriormente. Otros de dichos derivados se describen en los documentos WO020786737, WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO03065806.

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

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

- 5 En una realización, el adyuvante usado para las composiciones de la invención comprende una emulsión de aceite en agua preparada a partir de aceite metabolizable (tal como escualeno), un emulsionante (tal como Tween 80) y opcionalmente un tocol (tal como alfa tocoferol). En una realización, el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,5-15, 1-13, 2-11, 4-8, o 5-6 mg (por ejemplo 2-3, 5-6, o 10-11 mg) de aceite metabolizable (tal como escualeno), 0,1-10, 0,3-8, 0,6-6, 0,9-5, 1-4, o 2-3 mg (por ejemplo 0,9-1,1, 2-3 o 4-5 mg) de emulsionante (tal como Tween 80) y opcionalmente 0,5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 mg (por ejemplo 11-13, 5-6, o 2-3 mg) de tocol (tal como alfa tocoferol).
- Este adyuvante puede además comprender opcionalmente 5-60, 10-50, o 20-30 μg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 μg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).
- 10 Estos adyuvantes son particularmente adecuados para formulaciones de vacuna para lactantes o para ancianos. En una realización, la composición de vacuna de la divulgación que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacáridos derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender uno o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en los que el título de anticuerpos GMC inducido contra uno o más (o todos) de los componentes de vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en seres humanos vacunados.
- 15 Este adyuvante puede contener opcionalmente 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, o 0,125-0,25 mg (por ejemplo 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 o 0,125 mg) de esteroles (por ejemplo colesterol), 5-60, 10-50, o 20-30 μg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 μg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL), y 5-60, 10-50, o 20-30 μg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 μg) de saponina (por ejemplo QS21).
- 20 Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones de vacunas para ancianos. En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacáridos derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender uno o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en los que el título de anticuerpo GMC inducido contra uno o más (o todos) de los componentes de la vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en seres humanos vacunados.
- 25 En una realización, el adyuvante usado para las composiciones de la invención comprende fosfato de aluminio y un derivado de lípido A (tal como 3D-MPL). Este adyuvante puede comprender (por dosis de 0,5 ml) 100-750, 200-500, o 300-400 μg de Al como fosfato de aluminio, y 5-60, 10-50, o 20-30 μg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 μg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).
- 30 Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones de vacunas para ancianos o lactantes. En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacáridos derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender uno o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en los que el título de anticuerpos GMC inducido contra uno o más (o todos) de los componentes de la vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en seres humanos vacunados.
- 35 Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar un mamífero susceptible a infección mediante la administración de dicha vacuna por una vía de administración sistémica o a través de la mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección por las vías de administración intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por administración a través de la mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía o de otitis media (ya que se puede prevenir más eficazmente el transporte nasofaríngeo de neumococos, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, los componentes de la misma se pueden coadministrar juntos al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo, se podrían administrar conjugados de sacáridos de neumococos por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquiera de los componentes proteicos bacterianos de la vacuna para la coordinación óptima de la respuesta inmune uno con respecto al otro). Para la coadministración, el adyuvante opcional de Th1 puede estar presente en cualquiera o en todas las diferentes administraciones. Además de la vía única de administración, se pueden usar 2 vías diferentes de administración. Por ejemplo, los sacáridos o los conjugados de sacárido se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de inmunización e IN para dosis de refuerzo.
- 40
- 45
- 50 El contenido de antígenos proteicos en la vacuna típicamente estará en el intervalo de 1-100 μg , preferentemente 5-50 μg , más típicamente en el intervalo de 5 - 25 μg . Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.
- 55 La preparación de la vacuna se describe en líneas generales en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación en liposomas se describe por Fullerton, Patente de Estados Unidos 4.235.877.
- 60 Las vacunas de la presente invención se pueden almacenar en solución o liofilizadas. Preferentemente, la solución se liofiliza en presencia de un azúcar tal como sacarosa o lactosa. Es más preferible liofilizarlas y reconstituirlas de forma improvisada antes de su uso. La liofilización puede producir una composición más estable (vacuna) y posiblemente puede conducir a títulos de anticuerpos más elevados en presencia de 3D-MPL y en ausencia de un adyuvante basado en aluminio.
- 65 En un aspecto de la invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que además comprende un vial que contiene un adyuvante como se ha descrito en este documento. Se prevé que en este aspecto de la invención, el adyuvante se usará para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Aunque las vacunas de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía, la administración en la piel (ID) de las vacunas descritas forma una realización de la presente invención. La piel del ser humano comprende una cutícula externa "callosa", denominada el estrato córneo, que cubre la epidermis. Debajo de esta epidermis hay una capa denominada dermis, que a su vez cubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular la dermis, estimula una repuesta inmune, que también se puede asociar a varias ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en este documento forma una característica preferida de la presente invención.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento de mantoux" comprende etapas de limpieza de la piel, y el estiramiento con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) hacia arriba se inserta la aguja a un ángulo entre 10-15°. Una vez que se ha insertado el bisel de la aguja, se baja el tambor de la aguja y se avanza adicionalmente hasta que proporciona una ligera presión para elevarlo por debajo de la piel. El líquido se inyecta después muy lentamente formando de este modo una ampolla o ampolla dura en la superficie de la piel, seguida de la retirada lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que están diseñados específicamente para administrar agentes líquidos en o por toda la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección a chorro descritos por ejemplo en los documentos WO 01/13977; US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos para administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para el suministro balístico de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicarse a la superficie de la piel (suministro transdérmico o transcutáneo de los documentos WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención tienen que administrarse a la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen líquido bajo, particularmente un volumen de aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

El contenido de antígenos en vacunas cutáneas o intradérmicas de la presente invención puede ser similar a dosis convencionales como se encuentran en vacunas intramusculares (véase anteriormente). Sin embargo, una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas es que las formulaciones puedan ser "de dosis baja". Por consiguiente, los antígenos proteicos en vacunas "de dosis baja" están presentes preferentemente en cantidades tan pequeñas como de 0,1 a 10 µg, preferentemente 0,1 a 5 µg por dosis; y los antígenos sacáridos (preferentemente conjugados) pueden estar presentes en el intervalo de 0,01-1 µg, y preferentemente entre 0,01 y 0,5 µg de sacárido por dosis.

Como se usa en este documento, la expresión "suministro intradérmico" significa suministro de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no se situará necesariamente de forma exclusiva en la dermis. La dermis es la capa de la piel situada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm desde la superficie de la piel humana, pero hay cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, puede esperarse alcanzar la dermis yendo 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis se sitúa entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y las capas subcutáneas por debajo. Dependiendo del modo de suministro, la vacuna puede situarse finalmente exclusiva o principalmente en la dermis, o puede distribuirse finalmente dentro de la epidermis y la dermis.

La presente invención proporciona además una vacuna mejorada para la prevención o mejora de otitis media causada por *Haemophilus influenzae* mediante la adición de proteínas de *Haemophilus influenzae*, por ejemplo proteína D en forma libre o conjugada. Además, la presente invención proporciona adicionalmente una vacuna mejorada para la prevención o mejora de infecciones por neumococos en lactantes (por ejemplo, otitis media), dependiendo de la adición de una o dos proteínas de neumococos como proteínas libres o conjugadas a las composiciones conjugadas de *S. pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas de neumococos libres pueden ser iguales o diferentes a cualquier proteína de *S. pneumoniae* usada como vehículos proteicos. También pueden incluirse uno o más antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* en la vacuna de combinación en una forma libre o conjugada. Por tanto, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmune (protectora) contra otitis media en lactantes.

En otra realización, la presente invención es un procedimiento mejorado para producir una respuesta inmune (protectora) en lactantes (definidos como de 0-2 años de edad en el contexto de la presente invención) administrando una cantidad segura y eficaz de la vacuna de la invención [una vacuna pediátrica]. Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la provisión de las composiciones antigénicas del conjugado de *S. pneumoniae* de la invención para su uso en medicina y el uso de los conjugados de *S. pneumoniae* de la invención en la preparación de un medicamento para la prevención (o tratamiento) de enfermedades por neumococos.

En otra realización más, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmune (protectora) en la población anciana (en el contexto de la presente invención un paciente se considera anciano si tiene 50 años de edad o más, típicamente por encima de 55 y más generalmente por encima de 60 años) administrando una cantidad segura y eficaz de la vacuna de la invención, preferentemente junto con una o dos proteínas de *S. pneumoniae* presentes como proteína libre o conjugada, proteínas de *S. pneumoniae* libres que pueden ser iguales o diferentes a cualquier proteína de *S. pneumoniae* usada como vehículo proteico.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para inmunizar un huésped humano contra una enfermedad causada por *S. pneumoniae* y opcionalmente por infección por *Haemophilus influenzae* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención.

Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por *S. pneumoniae* y opcionalmente infección por *Haemophilus influenzae*.

5 Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por *S. pneumoniae* y opcionalmente infección por *Haemophilus influenzae*.

Los inventores pretenden que los términos “comprendiendo”, “comprenden” y “comprende” en este documento sean opcionalmente sustituibles por las expresiones “que está constituido por”, “constituidos por” y “constituido por”, respectivamente, en cada caso.

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

Para que la presente invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para propósitos de ilustración solamente, y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención de ninguna manera.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: EXPRESIÓN DE PROTEÍNA D

Proteína D de *Haemophilus influenzae*

Construcción genética para expresión de la Proteína D

Materiales de Partida

20 El ADN que codifica Proteína D

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

25 El vector de expresión pMG1

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

La cepa AR58 de *E. coli*

30 La cepa AR58 de *E. coli* se generó por transducción de N99 con una solución madre de fago P1 cultivada previamente en un derivado de SA500 (galE::TN10, lambdaKil cI857 H1). N99 y SA500 son cepas de *E. coli* K12 obtenidas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de Salud.

El vector de expresión pMG1

35 Para la protección de la proteína D, se ha clonado el ADN que codifica la proteína en el vector de expresión pMG1. Este plásmido utiliza señales del ADN del fago lambda para dirigir la transcripción y traducción de genes extraños insertados. El vector contiene el promotor PL, el operador OL y dos sitios de utilización (NutL y NutR) para aliviar efectos de polaridad transcripcional cuando se proporciona la proteína N (Gross y col., 1985). Se introducen los vectores que contienen el promotor PL en un huésped lisogénico de *E. coli* para estabilizar el ADN del plásmido. Las cepas huésped lisogénicas contienen ADN del fago lambda de replicación defectuosa integrado en el genoma (Shatzman y col., 1983). El ADN cromosómico del fago lambda dirige la síntesis de la proteína cI represora que se une al represor OL del vector y evita la unión de la ARN polimerasa al promotor PL y de este modo la transcripción del gen insertado. El gen cI de la cepa de expresión AR58 contiene un mutante sensible a temperatura de modo que la transcripción dirigida por PL puede regularse mediante un cambio de temperatura, es decir, un aumento en la temperatura del cultivo inactiva al represor y la síntesis de la proteína extraña se inicia. Este sistema de expresión permite una síntesis controlada de proteínas extrañas especialmente de las que pueden ser tóxicas para la célula (Shimataka y Rosenberg, 1981).

La cepa AR58 de *E. coli*

45 La cepa AR58 lisogénica de *E. coli* usada para la producción de proteína D de vehículo es un derivado de la cepa NIH *E. coli* K12 convencional N99 (F⁻ su⁻ galK2, lacZ⁻ thr⁻). Contiene un fago lambda lisogénico defectuoso (galE::TN10, lambdaKil⁻ cI857 H1). El fenotipo Kil⁻ evita la detección de la síntesis macromolecular del huésped. La mutación cI851 confiere una lesión sensible a temperatura al represor cI. La delección Δ H1 retira el operón derecho del fago lambda y los loci del huésped bio, uvr4, y chlA. La cepa AR58 se generó mediante la transducción de N99 con una solución madre de fago P1 cultivada previamente en un derivado de SA500 (galE::TN10, lambdaKil⁻ cI857 H1). La introducción del lisogén defectuoso en N99 se seleccionó con tetraciclina en virtud de la presencia de un transposón TN10 que codifica resistencia a tetraciclina en el gen galE adyacente.

Construcción del vector pMGMDPPrD

El vector pMG1 que contiene el gen que codifica la proteína S1 no estructural del virus de la gripe (pMGNSI) se usó para construir pMGMDPPrD. El gen de la proteína D se amplificó por PCR a partir del vector PHIC348 (Janson y col. 1991 Infect. Immun. 59:119-125) con cebadores de PCR que contenían sitios de restricción NcoI y XbaI en los extremos 5' y 3', respectivamente. El fragmento NcoI/XbaI se introdujo después en pMGNS1 entre NcoI y XbaI creando de este modo una proteína de fusión que contenía los 81 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 seguidos de la proteína PD. Este vector se marcó como pMGNS1 PrD.

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

----MDP SSHSSNMANT----

NS1

Proteína D

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

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

La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor lambda P_L/Operador O_L. La cepa huésped AR58 contiene un gen cI sensible a temperatura en el genoma que bloquea la expresión del lambda P_L a temperatura baja uniéndose a O_L. Una vez que la temperatura se ha elevado, se libera cI de O_L y se expresa la proteína D.

Preparación a pequeña escala

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

La extracción a partir de células recogidas y la purificación de proteína D se realizó de la siguiente manera. El sedimento de cultivo celular congelado se descongela y se resuspende en una solución de disolución celular (tampón citrato pH 6,0) hasta una DO₆₅₀ final de 60. La suspensión se pasa 2 veces a través de un homogeneizador a alta presión a una P = 100 MPa. El homogeneizado del cultivo celular se aclara por centrifugación y los restos celulares se retiran por filtración. En la primera etapa de purificación, el lisado filtrado se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose Fast Flow). PD se une a la matriz de gel por interacción iónica y se eluye por una etapa de aumento de la fuerza iónica del tampón de elución.

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

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

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

Preparación a Gran Escala

La extracción de células recogidas y la purificación de la proteína D se realizaron de la siguiente manera. El caldo recogido se enfría y se pasa directamente dos veces a través de un homogeneizador de alta presión a una presión de aproximadamente 80 MPa.

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

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

En las dos etapas de cromatografía en columna, la recogida de las fracciones se controla por DO. El flujo continuo de la cromatografía en columna de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra y se diafiltra por ultrafiltración.

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

Ejemplo 1b: EXPRESIÓN DE PhtD

La proteína PhtD es un miembro de la familia de proteínas de la tríada de histidina de neumococos (Pht) caracterizada por la presencia de tríadas de histidina (motivo HXXHXH). PhtD es una molécula de 838 aminoácidos

y lleva 5 tríadas de histidina, (véase MedImmune documento WO00/37105 SEC ID N° 4 para la secuencia de aminoácidos y SEC ID N° 5 para la secuencia de ADN). PhtD contiene también una región rica en prolina en el centro (posición de aminoácidos 348-380). PhtD tiene una secuencia señal N-terminal de 20 aminoácidos con un motivo LXXC.

5 Construcción genética

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

- 10 La reacción en cadena de la polimerasa se realizó para amplificar el gen *phtD* de un plásmido MedImmune (que lleva el gen *phtD* de la cepa de *Streptococcus pneumoniae* Norway 4 (serotipo 4) - SEC ID N° 5, como se describe en el documento WO 00/37105). Se usaron cebadores, específicos para el gen *phtD* solamente, para amplificar el gen *phtD* en dos fragmentos. Los cebadores llevan los sitios de restricción *NdeI* y *KpnI* o el *KpnI* y *XbaI*. Estos cebadores no hibridan con ningún nucleótido del vector sino solamente con secuencias génicas específicas de *phtD*.
- 15 Se insertó un codón de inicio ATG artificial usando el primer cebador que lleva el sitio de restricción *NdeI*. Los productos de PCR generados se insertaron después en el vector de clonación pGEM-T (Promega) y se confirmó la secuencia de ADN. Se realizó después la subclonación de los fragmentos en el vector de expresión TCMP14 usando técnicas convencionales y el vector se transformó en *E. coli* AR58.

Purificación de PhtD

20 La purificación de PhtD se consigue de la siguiente manera:

- Cultivo de células de *E. coli* en presencia de kanamicina: cultivar 30 horas a 30 °C, después inducción durante 18 horas a 39,5 °C.
- Rotura de las células de *E. coli* de cultivo completo a DO±115 en presencia de EDTA 5 mM y PMSF 2 mM como inhibidor de la proteasa. Rannie, 2 pasos, 100 MPa.
- 25 □ Captura de antígenos y retirada de restos celulares en cromatografía de modo de lecho expandido Streamline Q XL a temperatura ambiente (20 °C); la columna se lava con NaCl 150 mM + Empigen al 0,25 % pH 6,5 y se eluye con NaCl 400 mM + Empigen al 0,25 % en tampón de fosfato potásico 25 mM pH 7,4.
- Filtración en cartucho de Sartobran 150 (0,45 + 0,2 μ m).
- 30 □ Unión del antígeno en cromatografía sobre Zn⁺⁺ Sepharose Quelante FF IMAC a pH 7,4 en presencia de imidazol 5 mM a 4 °C; la columna se lava con imidazol 5 mM y Empigen al 1 % y se eluye con imidazol 50 mM, ambos en tampón fosfato potásico 25 mM pH 8,0.
- Cromatografía de intercambio aniónico débil en modo positivo en Fractogel EMD DEAE a pH 8,0 (Fosfato potásico 25 mM) a 4 °C; la columna se lava con NaCl 140 mM y se eluye en NaCl 200 mM mientras los contaminantes (proteínas y ADN) permanecen adsorbidos en el intercambiador.
- 35 □ Concentración y ultrafiltración con fosfato Na/K 2 mM pH 7,15 sobre una membrana de 50 kDa.
- Filtración a esterilidad de la carga purificada en un cartucho de filtro Millipak-20 de 0,2 μ m.

Ejemplo 1c: EXPRESIÓN DE PNEUMOLISINA

Se preparó pneumolisina de neumococos y se destoxificó como se describe en los documentos WO2004/081515 y WO2006/032499.

40 Ejemplo 2:

Preparación de conjugados

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

Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas para cada polisacárido. Estas se dan en la Tabla 1. El polisacárido con el tamaño ajustado (excepto para PS5, 6B y 23F) se disolvió en NaCl 2 M, NaCl 0,2 M o en agua para inyección (WFI). La concentración óptima de polisacáridos se evaluó para todos los serotipos. Todos los serotipos excepto el serotipo 18C se conjugaron directamente al vehículo proteico como se detalla a continuación.

50 Se prepararon dos conjugados de serotipo alternativo 22F; uno conjugado directamente; uno a través de un engarce ADH.

De una solución madre de 100 mg/ml en acetonitrilo o solución de acetonitrilo/agua 50 %/50 %), se añadió CDAP (proporción de CDAP/PS 0,5-1,5 mg/mg de PS) a la solución de polisacáridos. Después de 1,5 minutos se añadió NaOH 0,2 M-0,3 M para obtener el pH de activación específico. La activación del polisacárido se realizó a este pH durante 3 minutos a 25 °C. Se añadió proteína purificada (proteína D, PhtD, pneumolisina o DT) (la cantidad depende de la proporción de PS/vehículo proteico inicial) al polisacárido activado y se realizó la reacción de acoplamiento al pH específico durante hasta 2 horas (dependiendo del serotipo) con regulación del pH. Para

inactivar los grupos de éster de cianato que no reaccionaron, se añadió una solución de glicina 2 M a la mezcla. El pH se ajustó al pH de inactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a 25 °C y después durante una noche a 2-8 °C con agitación lenta continua.

Preparación de 18C

- 5 Se unió 18C al vehículo proteico por un engarce - dihidrazida del ácido adípico (ADH). El serotipo del polisacárido 18C se microfluidizó antes de la conjugación.

Derivatización de toxoide tetánico con EDAC

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

15 Acoplamiento químico de TT_{AH} con PS 18C

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

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

- 20 Se añadió una solución de CDAP (100 mg/ml recién preparado en 50/50 v/v de acetonitrilo/WFI) para alcanzar la proporción de CDAP/PS apropiada.

El pH se elevó hasta el pH de activación 9,0 por la adición de NaOH 0,3 M y se estabilizó a este pH hasta la adición de TT_{AH}.

- 25 Después de 3 minutos, se añadió TT_{AH} derivatizado (20 mg/ml en NaCl 0,2 M) para alcanzar una proporción de TT_{AH}/PS de 2; el pH se reguló hasta el pH de acoplamiento 9,0. La solución se dejó una hora con regulación de pH.

Para inactivar, se añadió una solución de glicina 2 M, a la mezcla PS/TT_{AH}/CDAP.

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

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

Conjugado PS22F_{AH}-PhtD

- 30 En un segundo procedimiento de conjugación para este sacárido (siendo el primero el procedimiento de conjugación de PS22-PhtD mostrado en la Tabla 1) se unió 22F al vehículo proteico mediante un engarce - dihidrazida del ácido adípico (ADH). El serotipo 22F del polisacárido se microfluidizó antes de la conjugación.

Derivatización de PS 22F

La activación y el acoplamiento se realizan a 25 °C en agitación continua en un baño de agua a temperatura controlada.

- 35 El PS22F microfluidizado se diluyó para obtener una concentración final de PS de 6 mg/ml en NaCl 0,2 M y la solución se ajustó a pH $6,05 \pm 0,2$ con HCl 0,1 N.

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

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

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

El derivado PS_{AH} se concentró y diafiltró

Acoplamiento

- 45 Se añadió PhtD a 10 mg/ml en NaCl 0,2 M al derivado PS22F_{AH} para alcanzar una proporción de PhtD/PS22F_{AH} de 4/1 (p/p). El pH se ajustó a $5,0 \pm 0,05$ con HCl. La solución de EDAC (20 mg/ml en Tris-HCl 0,5 M pH 7,5) se añadió de forma manual en 10 minutos (250 μ l/min) hasta alcanzar 1 mg de EDAC/mg de PS22F_{AH}. La solución resultante se incubó durante 150 min (aunque también se usaron 60 minutos) a 25 °C en agitación y regulación de pH. La solución se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl 1 M pH 7,5 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a 25 °C.

- 50 Antes de la elución en Sephacryl S400HR, el conjugado se aclaró usando un filtro Minisart de 5 μ m.

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

Purificación de los conjugados:

- 55 Los conjugados se purificaron mediante filtración en gel usando una columna de filtración en gel Sephacryl S400HR equilibrada con NaCl 0,15 M (S500HR para 18C) para retirar moléculas pequeñas (incluyendo DMAP) y PS y proteína no conjugada. Basándose en los diferentes tamaños moleculares de los componentes de reacción, se eluyen primero PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-pneumolisina o PS-DT-conjugados, seguidos de PS libre, después por PD libre o DT libre y finalmente DMAP y otras sales (NaCl, glicina).

- 60 Las fracciones que contienen conjugados se detectan mediante UV_{280 nm}. Las fracciones se reúnen de acuerdo con su Kd, se filtran a esterilidad (0,22 μ m) y se almacenan a +2-8 °C. Se determinaron las proporciones PS/Proteína en las preparaciones de conjugados.

Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/TT/TT/PhtD/Ply

Donde "µfluido" aparece en una fila de encabezamiento, indica que se ajustó el tamaño del sacárido mediante microfluidización antes de la conjugación. Los tamaños de los sacáridos después de la microfluidización se dan en la Tabla 2.

5

Tabla 1 Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/TT/TT/PhtD/Ply

Serotipo	1 µfluido	4 µfluido	5	6A	6B	7F µfluido
Conc. de PS (mg/ml)	2,5	2,5	7,1	5,0	5,0	5,0
Disolución de PS	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc. de PD (mg/ml)	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	10,0
Proporción inicial de PD/PS (p/p)	1,5/1	1,5/1	1/1	1/1	1,1/1	1,2/1
Conc. de CDAP. (mg/mg PS)	0,50	0,50	0,79	0,83	0,83	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0

Serotipo	9V µfluido	14 µfluido	18C µfluid	19A µfluido	19F µfluido	22F µfluido	23F
Conc. de PS (mg/ml)	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0	2,38
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0,2M	NaCl 2M
Conc. de vehículo proteico (mg/ml)	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0 (Ply)	20,0 (DT)	10,0 (PhtD)	5,0
Proporción inicial de vehículo proteico/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1	1/1
Conc. de CDAP. (mg/mg PS)	0,50	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	0,79
pH _a =pH _c =pH _q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0

Nota: pH_a,c,q corresponde al pH de activación, acoplamiento e interrupción, respectivamente.

10 **Caracterización:**

Cada conjugado se caracterizó y satisfizo las especificaciones descritas en la Tabla 2. El contenido de polisacáridos (µ/ml) se midió mediante el ensayo de Resocinol y el contenido de proteínas (µg/ml) mediante el ensayo de Lowry. La proporción final de PS/PD (p/p) se determina mediante la proporción de las concentraciones.

Contenido de polisacárido libre (%):

15 El contenido de polisacárido libre de los conjugados mantenidos a 4 °C o almacenados 7 días a 37 °C se determinó sobre el sobrenadante obtenido después de la incubación con anticuerpos de vehículo proteico α y sulfato de amonio saturado, seguido de centrifugación.

Se usó un ELISA α -PS/ α -PS para la cuantificación del polisacárido libre en el sobrenadante. La ausencia de conjugados se controló también mediante un ELISA de vehículo proteico α/α -PS.

Antigenicidad:

5 La antigenicidad sobre los mismos conjugados se analizó en un ELISA de tipo sándwich en el que la captura y la detección de anticuerpos fueron α -PS y α -Proteína, respectivamente.

Contenido de proteína libre (%):

10 El vehículo proteico no conjugado puede separarse del conjugado durante la etapa de purificación. El contenido de proteína libre residual se determinó usando cromatografía de exclusión de tamaño (TSK 5000-PWXL) seguida de detección UV (214 nm). Las condiciones de elución permitieron separar el vehículo proteico libre y el conjugado. El contenido de proteína libre en las cargas de conjugado se determinó después frente una curva de calibrado (de 0 a 50 μ g/ml de vehículo proteico). El % de vehículo proteico libre se obtuvo de la siguiente manera. % de vehículo libre = (vehículo libre (μ g/ml))/(concentración total del vehículo proteico correspondiente medida mediante Lowry (μ g/ml) * 100 %).

Estabilidad:

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

La caracterización 10/11/13/14-valente se da en la Tabla 2 (véase comentario debajo).

Los conjugados de proteína pueden adsorberse sobre fosfato de aluminio y reunirse para formar la vacuna final.

Conclusión:

20 Se han producido conjugados inmunogénicos que han demostrado ser componentes de una vacuna prometedora.

TABLA 2 – características de los conjugados

Conjugados	Tamaño de PS (Dax10 ³)	Proporción de vehículo/PS	PS libre (Elisa)	Vehículo Libre	Antigenicidad de PS (Elisa)	Tamaño de los Conj. (kDa)
PS1-PD	349-382*	1,5-1,6	1,0 %-1,2 %	3,9 %-4,8 %	87 %-95 %	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1,5-1,6	4,7-6,5 %	3,2 %-4,0 %	90 %-96 %	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0,80	8,7-11,2 %	2,2 %-3,8 %	93 %-108 %	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0,61	4,5 %	No realizado	45,9 %	No realizado
PS6B-PD***	1069-1391	0,7-0,8	1,3-1,6 %	<2,0 %	68 %-75 %	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1,1-1,2	<1 %	<1,4 %	58 %	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1,3-1,5	<1 %	<1,3 %	67 %-69 %	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1,4	<1 %	<1,5 %	70 %	3430-3779
PS18C-TT ^{II}	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2 %	<4 %	46 %-56 %	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3,2	<1 %		29 %	
PS19F-DT	133-143*	1,4-1,5	4,1 %-5,9 %	<1,2 %-<1,3 %	82 %-88 %	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2,17	5,8	No realizado	37 %	No realizado
PS22F-AHPhtD*	159-167	3,66-4,34	<1 %	No realizado	28-31 %	No realizado
PS23F-PD***	914-980	0.5	1,4-1,9 %	3,7 %-4,9 %	137 %-154 %	2933-3152

*Tamaño de PS después de la microfluidización del PS nativo.

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

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

Diseño del estudio.

5 El estudio usado en una vacuna 11Pn-PD, que comprende los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugado cada uno a proteína D de *H. influenzae* (referidos en la Tabla 5 en el Ejemplo 4). Los sujetos se distribuyeron al azar en dos grupos para recibir cuatro dosis de la vacuna 11Pn-PD o *Havrix* a aproximadamente 3, 4, 5 y 12-15 meses de edad. Todos los sujetos recibieron la vacuna *Infanrix-hexa* (DTPa-HBV-IPV/Hib) de GSK Biologicals' de forma concomitante en los 3, 4 y 5 meses de edad. *Infanrix-hexa* es una combinación de *Pediarix* y Hib mezclada antes de la administración. El seguimiento de la eficacia para el análisis "de acuerdo con el protocolo" comenzó dos semanas después de la administración de la tercera dosis de vacuna y continuó hasta los 24-27 meses de edad. Se evaluó el transporte nasofaríngeo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en un subconjunto seleccionado de los sujetos.

10 Se aconsejó a los padres consultar al investigador si su hijo estaba enfermo, tenía dolor de oídos, perforación espontánea de la membrana timpánica o descarga del oído espontánea. Si el investigador sospechaba un episodio de AOM, se remitía al niño inmediatamente a un otorrinolaringólogo para la confirmación del diagnóstico.

15 Un diagnóstico clínico de AOM se basaba en la apariencia visual de la membrana timpánica (es decir, enrojecimiento, abombamiento, pérdida del reflejo de la luz) o la presencia de la efusión de un fluido del oído medio (como se demostraba por una otoscopia simple o neumática o mediante microscopía). Además, tenían que estar presentes al menos dos de los siguientes signos o síntomas: dolor de oído, descarga de oído, pérdida de audición, letargia, irritabilidad, anorexia, vómitos o diarrea. Si el otorrinolaringólogo confirmaba el diagnóstico clínico, se recogía una muestra el fluido del oído medio mediante timpanocentesis para ensayo bacteriológico.

20 Para sujetos con visitas repetidas para la enfermedad, se consideraba que había empezado un nuevo episodio de AOM si habían pasado más de 30 días desde el comienzo del episodio anterior. Además, se consideraba que un episodio AOM era un nuevo episodio bacteriano si el serotipo/bacteria aislado era diferente del aislado previo fuera cual fuera el intervalo entre los dos episodios consecutivos.

25

Resultados de ensayo

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

Episodios clínicos y definición del caso AOM

30 Durante el periodo de seguimiento por protocolo, se registraron un total de 333 de AOM clínico en el grupo 11Pn-PD y 499 en el grupo de control.

La Tabla 3 representa la eficacia protectora de la vacuna 11Pn-PD y ambas vacunas 7-valentes ensayadas previamente en Finlandia (Eskola y col N Engl J Med 2001; 344: 403 – 409 y Kilpi y col Clin Infect Dis 2003 37:1155-64) contra cualquier episodio de AOM y AOM causado por diferentes serotipos de neumococos, *H. influenzae*, *NTHi* y *M. catarrhalis*.

35 Se consiguió una reducción estadísticamente significativa y clínicamente relevante del 36,6 % de la carga global de enfermedad AOM con 11Pn-PD, sin importar la etiología (Tabla 3).

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

40 Otro descubrimiento importante en el estudio actual es la protección del 35,6 % proporcionada por la vacuna 11Pn-PD contra AOM causada por *H. influenzae* (y específicamente 35,3 % de protección proporcionada mediante NTHi). Este descubrimiento es de gran significado clínico, dada la importancia aumentada de *H. influenzae* como una causa principal de AOM en la era de las vacunas conjugadas de neumococos. En línea con la protección proporcionada contra AOM, la vacuna 11Pn-PB también redujo el transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* después de la dosis de refuerzo en el segundo año de vida. Estos descubrimientos contrastan con observaciones previas en Finlandia donde, para las vacunas 7-valentes conjugadas de neumococos, se observó un aumento en episodios de AOM debido a *H. influenzae* (Eskola y col y Kilpi y col) como prueba de reemplazo etiológico.

45

50 No pudo establecerse una correlación clara entre la protección contra episodios de AOM debidos a Hi y los niveles de anticuerpos contra el vehículo proteico D, puesto que las concentraciones de anticuerpos de IgG anti-PD después de la principal en vacunas 11Pn-PD, que permanecían sin episodios Hi AOM, eran esencialmente las mismas que los niveles de anticuerpos de IgG anti-PD después de la principal medidos en vacunas 11Pn-PD que desarrollaban al menos un episodio de Hi AOM durante el periodo de seguimiento de la eficacia. Sin embargo, aunque no pudo establecerse correlación entre el impacto biológico de la vacuna y la inmunogenicidad IgG anti-PD después de la principal, es razonable asumir que el vehículo proteico PD, que se conserva altamente entre las cepas de *H. influenzae*, ha contribuido en gran medida a la inducción de la protección contra Hi.

55

El efecto sobre la enfermedad AOM se acompañó de un efecto sobre el transporte nasofaríngeo que fue de similar magnitud para las vacunas de serotipo de neumococos y *H. influenzae* (Figura 1). Esta reducción del transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* en las vacunas conjugadas a PD apoya la hipótesis de un efecto protector directo de la vacuna conjugada a PD contra *H. influenzae*, incluso si la eficacia protectora no pudiera relacionarse con las respuestas inmunes de IgG anti-PD como se mide mediante ELISA.

60

En un siguiente experimento se usó un modelo de otitis media de chinchilla con reservas de suero de lactantes inmunizados con la formulación 11-valente de este ejemplo o con la vacuna 10-valente del ejemplo 2 (véase también Tabla 1 y 2 y comentarios debajo). Ambas reservas inducen una reducción significativa del porcentaje de los animales con otitis media frente a las reservas de suero pre-inmunes. No hay diferencia significativa entre las reservas inmunes 10 y 11-valentes. Esto demuestra que ambas vacunas tienen un potencial similar para inducir protección contra otitis

65

media causada por *H. influenzae* no tipificable en este modelo.

Tabla 3

Tipo de episodio de AOM	11Pn-Pd						Pprevnar en FinOM (Eskola y col)						7v.OMP en FinOM (Killip y col)					
	n		VE		n		VE		n		VE		n		VE			
	11Pn-PD	Control	%	LL	UL	7v-CRM	Control	%	LL	UL	7v-OMP	Control	%	LL	UL			
N	2455	2452				786	794				805	794						
cualquier AOM	333	499	33,6	20,8	44,3	1251	1345	6	-4	16	1364	1345	-1	-12	10			
cualquier AOM con MEF	322	474	32,4	19,0	43,6	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10			
Cultivo con neumococos confirmados	92	189	51,5	36,8	62,9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37			
serotipos de vacunas de neumococos(*)	60	141	57,6	41,4	69,3	107	250	57	44	67	110	250	56	44	66			
Otros patógenos bacterianos																		
<i>H. influenzae</i>	44	68	35,6	3,8	57,0	315	287	-11	-34	8	315	287	-9	-32	10			
<i>H. influenzae</i> no tipificable (NTHI)	41	63	35,3	1,8	57,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP			
<i>M. catarrhalis</i>	31	34	9,4	-52,5	46,1	379	381	-1	-19	15	444	381	-16	-36	2			

NP = No publicado; N = número de sujetos en una cohorte de eficacia de ATP; n = número de episodios
 *Serotipos de vacunas de neumococos: para 11Pn-Pd = 11 serotipos, para Pprevnar y 7v-OMP = 7 serotipos
 MEF = Fluido del oído medio

Ejemplo 4:

Selección de vehículo proteico para el serotipo 19F

Ensayo ELISA usado

5 El procedimiento de ELISA de inhibición de 22F se basaba esencialmente en un ensayo propuesto en 2001 por Concepcion y Frasch y se notificó por Henckaerts y col., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360. En resumen, los polisacáridos de neumococos purificados se mezclaron con albúmina de suero humana metilada y se adsorbieron en placas de microtitulación de alta unión Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) durante una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con suero fetal bovino (FBS) al 10 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las muestras de suero se diluyeron en PBS que contenía FBS al 10 %, 10 µg/ml de polisacárido de la pared celular (SSI) y 2 µg/ml de polisacárido de neumococos del serotipo 22F (ATCC) y se diluyeron adicionalmente en las placas de microtitulación con el mismo tampón. Se trató una referencia interna calibrada contra el suero patrón 89-SF usando las concentraciones de IgG específicas para serotipo en 89-SF, de la misma manera y se incluyó en cada placa. Después de lavar, los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Stratech Scientific Ltd., Soham, Reino Unido) diluido en FBS al 10 % (en PBS), y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación. El color se desarrolló usando un kit de sustrato para inmunoensayo de enzima peroxidasa de único componente tetrametilbenzidina listo para usar (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió con H₂SO₄ 0,18 M y la densidad óptica se leyó a 450 nm. Las concentraciones de IgG específica para serotipo (en µg/ml) en las muestras se calcularon con referencia a los puntos de densidad óptica dentro de límites definidos a la curva de referencia interna del suero, que se modelizó mediante una ecuación logarítmica logística de 4 parámetros calculada con software SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El límite para el ELISA fue de 0,5 µg/ml de IgG para todos los serotipos teniendo en cuenta el límite de detección y el límite de cuantificación.

Ensayo de opsonofagocitosis

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

Preparación de los conjugados

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

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

35 La tabla 10 muestra las concentraciones de anticuerpo 22F-ELISA y los porcentajes de sujetos que alcanzan el umbral de 0,2 µg/ml antes y después de la vacunación de refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente. La actividad opsonofagocítica se muestra claramente mejorada por los anticuerpos inducidos con estas formulaciones 19F-DT, como se demuestra mediante las tasas de seropositividad más altas (títulos opsonofagocíticos ≥ 1:8) y GMT de OPA un mes después de la vacunación principal (Tabla 9). Un mes después de la vacunación de refuerzo con el polisacárido sencillo 23-valente, la actividad opsonofagocítica de los anticuerpos 19F permanecía significativamente mejor para niños sensibilizados con formulaciones 19F-DT (11).

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

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

Tabla 4 Formulaciones de vacuna conjugada de neumococos usadas en estudios clínicos

Formulación	µg de serotipo de neumococo/vehículo proteico											Al ³⁺ mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	<0,8
19F-DT Forma 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	5/DT	≤0,35
19F-DT Forma 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤0,35

50

(continuación)

Formulación	μg de serotipo de neumococo/vehículo proteico											Al ³⁺ mg	
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F		
19F-DT Forma 3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	3/PD	= 0,5

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

Serotipo	1 Nativo	3 μ fluido	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F Nativo
conc. de PS (mg/ml)	1,5	2	2,0	7,5	5,5	3,0
Disolución de PS	NaCl 150 mM	NaCl 2 M	WFI	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M
conc. de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporción inicial de PS/PD (p/p)	1/0,7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0
Tiempo de acoplamiento	60 minutos	60 minutos	45 minutos	40 minutos	60 minutos	60 minutos

5

Serotipo	9V Nativo	14 Nativo	18C Nativo	19F Nativo	23F Nativo
conc. de PS (mg/ml)	1,75	2,5	1,75	4,0	2,5
Disolución de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M
conc. de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proporción inicial de PS/PD (p/p)	1/0,75	1/0,75	1/1,2	1/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0
Tiempo de acoplamiento	60 minutos	60 minutos	45 minutos	30 minutos	60 minutos

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

Serotipo	1 μ fluido	3 μ fluido	4 μ fluido	5 μ fluido	6B μ fluido	7F Nativo
conc. de PS (mg/ml)	4	2,0	2,5	7,5	10	3,0
Disolución de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M				
conc. de PD (mg/ml)	10,0	5,0	5,0	5,0 NaCl 2 M	20 (DT) NaCl 2 M	5,0

10

(continuación)

Serotipo	1 μfluido	3 μfluido	4 μfluido	5 μfluido	6B μfluido	7F Nativo
Proporción inicial de PS/PD (p/p)	1,2/1	1/1	1/1	1/1	1,5/1	1/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	1,50	0,75	1,5	2	1,5	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9/9/9
Tiempo de acoplamiento	60 minutos	60 minutos				

Serotipo	9V Nativo	14 Nativo	18C μfluido	19F μfluido	23F μfluido
conc. de PS (mg/ml)	1,75	2,5	5,0	9,0	10
Disolución de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
conc. de vehículo proteico (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	20 (DT)	10 (DT)
Proporción inicial de vehículo proteico/PS (p/p)	0,75/1	0,75/1	1,2/1	1,5/1	1,5/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	1,5	1,5	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Tiempo de acoplamiento	60 minutos	60 minutos	30 minutos	60 minutos	60 minutos

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

5

Serotipo	1 Nativo	3 μfluido	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F μfluido
conc. de PS (mg/ml)	1,5	2,0	2	7,5	5,5	5,0
Disolución de PS	NaCl 150 mM	NaCl 2 M	WFI	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M
conc. de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5	10
Proporción inicial de PS/PD (p/p)	0,7/1	1/1	1	1/1	1/1	1,2/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9
Tiempo de acoplamiento	60 minutos	60 minutos	45 minutos	40 minutos	60 minutos	60 minutos

Serotipo	9V μfluido	14 μfluido	18C Nativo	19F μfluido	19F μfluido	23F μfluido
conc. de PS (mg/ml)	5,0	5,0	1,75	9,0	10,0	9,5
Disolución de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
conc. de vehículo proteico (mg/ml)	10	10,0	5,0	20 (DT)	5,0 (PD)	10
Proporción inicial de vehículo proteico/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	1,2/1	1,5/1	1,2/1	1/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,5	0,75	0,75	1,5	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Tiempo de acoplamiento	60 minutos	60 minutos	45 minutos	120 minutos	120 minutos	60 minutos

5 **Tabla 8 Porcentaje de sujetos con concentración de anticuerpos 19F ≥ 0,20 μg/ml y media geométrica de las concentraciones de anticuerpo 19F (GMC con 95 % de IC; μg/ml) un mes después de 1 μg de 19F-PD, 3 μg de 19F-DT o Pevnar (2 μg de 19F-CRM) vacunación principal (cohorte Total)**

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

[†] La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4

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

Grupo	11Pn-PD&Di-001			11Pn-PD&Di-007		
	N	\geq 1:8 (95 % IC)	GMT (95 % IC)	N	\geq 1:8 (95 % IC)	GMT (95 % IC)
11Pn-PD	136	84,6 (77,4-90,2)	77,8 (58,1-104,4)	46	95,7 (85,2-99,5)	167,8 (118,1-238,6)
19F-DT Forma 1 [†]	137	95,6 (90,7-98,4)	263,2 (209,4-330,7)	-	-	-
19F-DT Forma 2 [†]	139	92,1 (86,3-96,0)	218,9 (166,5-287,9)	-	-	-
19F-DT Forma 3 [†]	-	-	-	49	91,8 (80,4-97,7)	403,1 (225,7-719,9)
<i>Prevnar</i>	131	86,3 (79,2-91,6)	82,6 (61,1-111,6)	38	81,6 (65,7-92,3)	65,0 (37,7-112,2)

[†] La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4

5 **Tabla 10 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos 19F \geq 0,20 μ g/ml y GMC de anticuerpo 19F (μ g/ml) antes de y un mes después del refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente en niños sensibilizados con 1 μ g de 19F-PD, 3 μ g de 19F-DT o *Prevnar* (2 μ g de 19F-CRM) (cohorte Total)**

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

[†] La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 11 Porcentaje de sujetos con un título OPA 19F \geq 1:8 y GMT de OPA de anticuerpo 19F antes de y un mes después del refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente en niños sensibilizados con 1 μ g de 19F-PD, 3 μ g de 19F-DT o *Prevnar* (2 μ g de 19F-CRM) (cohorte Total)

Grupo Principal	11Pn-PD&Di-002					
	Antes de la vacunación de refuerzo			Un mes después del refuerzo de PS 23-valente		
	N	% \geq 1:8 (95 % IC)	GMT (95 % IC)	N	% \geq 1:8 (95 % IC)	GMT (95 % IC)
11Pn-PD	29	27,6 (12,7-47,2)	10,9 (5,0-23,7)	28	82,1 (63,1-93,9)	408,0 (157,3-1058,3)
19F-DT Forma 1 [†]	19	47,4 (24,4-71,1)	18,1 (7,2-45,7)	18	94,4 (72,7-99,9)	1063,8 (386,6-2927,5)
19F-DT Forma 2 [†]	27	33,3 (16,5-54,0)	8,5 (4,7-15,3)	28	100 (87,7-100)	957,6 (552,8-1659,0)
<i>Prevnar</i>	24	12,5 (2,7-32,4)	8,1 (3,4-19,6)	23	82,6 (61,2-95,0)	380,9 (133,2-1089,5)

[†] La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

5 Tabla 12 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpo \geq 0,2 μ g/ml, OPA \geq 1:8 y GMC/GMT contra neumococos 19F un mes después de refuerzo de 11Pn-PD o *Prevnar* en niños sensibilizados con 1 μ g de 19F-PD, 3 μ g de 19F-DT o *Prevnar* (2 μ g de 19F-CRM) (cohorte Total)

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

[†] La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 13 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpo $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$, OPA $\geq 1:8$ y GMC/GMT contra neumococos 19A un mes después de la vacunación principal con $1 \mu\text{g}$ de 19F-PD, $3 \mu\text{g}$ de 19F-DT o *Prevnar* ($2 \mu\text{g}$ de 19F-CRM) (cohorte Total)

Grupo	11Pn-PD&Di-001					
	Ensayo 22F-ELISA			Ensayo OPA		
	N	% $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ (95 % IC)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95 % IC)	N	% $\geq 1:8$ (95 % IC)	GMT (95 % IC)
11Pn-PD	45	28,9 (16,4-44,3)	0,09 (0,07-0,11)	52	7,7 (2,1-18,5)	5,2 (4,0-6,8)
19F-DT Forma 2 ^r	51	29,4 (17,5-43,8)	0,11 (0,08-0,16)	59	27,1 (16,4-40,3)	12,4 (7,6-20,3)
<i>Prevnar</i>	55	18,2 (9,1-30,9)	0,10 (0,08-0,12)	61	3,3 (0,4-11,3)	4,6 (3,8-5,6)

^r La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

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

Para optimizar la respuesta provocada por vacunas conjugadas de neumococos en la población anciana, GSK formuló una vacuna conjugada de polisacáridos (PS) 11-valente con un nuevo adyuvante Adyuvante C – véase a continuación.

10 Se inmunizaron grupos de 5 monos Rhesus ancianos (14 a 28 años de edad) por vía intramuscular (IM) en los días 0 y 28 con $500 \mu\text{l}$ de PS conjugados 11-valentes adsorbidos en $315 \mu\text{g}$ de AlPO₄ o PS conjugados 11-valentes mezclados con Adyuvante C.

15 En las dos formulaciones de vacuna, los PS conjugados 11-valentes estaban constituidos cada uno de los siguientes conjugados PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT y PS6B-DT. La vacuna usada fue 1/5 de la dosis de una dosis humana de la vacuna ($5 \mu\text{g}$ de cada sacárido por cada dosis humanas excepto para 6B [$10 \mu\text{g}$]) conjugada de acuerdo con las condiciones de la Tabla 6 (Ejemplo 4), excepto para 19F y se hizo de acuerdo con las siguientes condiciones del procedimiento CDAP: sacárido con un tamaño de 9 mg/ml , PD a 5 mg/ml , una proporción inicial de PD/PS de 1,2/1, una concentración de CDAP de $0,75 \text{ mg/mg}$ de PS, pH_a=pH_c=pH_q 9,0/9,0/9,0 y un tiempo de acoplamiento de 60 minutos.

20 Los niveles de IgG de ELISA anti-PS y los títulos de opsono-fagocitosis se dosificaron en sueros recogidos en el día 42. Las frecuencias de células B de memoria anti-PS34 se midieron mediante Elispot a partir de células de la sangre periférica recogidas en el día 42.

25 De acuerdo con los resultados mostrados a continuación en este documento, el adyuvante C mejoró de forma significativa la inmunogenicidad PS conjugados 11-valentes frente a conjugados con AlPO₄ en monos ancianos. El nuevo adyuvante potenció las respuestas de IgG a PS (Figura 1) y los títulos de opsono-fagocitosis de anticuerpos (Tabla 14). También hubo pruebas que apoyaban que la frecuencia de células B de memoria específicas de PS3 aumenta mediante el uso de adyuvante C (Figura 2).

Tabla 14, inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus ancianos (los títulos de opsonofagocitosis post-II)

	PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
AIP04 11- valente	Preimmune	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8
	día 14 después de II	8	181	64	49	4096	42	37	169	64	<64
Ady-C 11 valente	Preimmune	5	9	<8	5	37	<8	<8	<8	<8	<8
	día 14 después de II	776	1351	891	676	16384	111	161	7132	2048	<64

Elispot de células B

El principio del ensayo depende del hecho de que las células B de memoria maduran en células de plasma *in vitro* después del cultivo de CpG durante 5 días. Las células de plasma específicas para antígeno generadas *in vitro* pueden detectarse fácilmente y por lo tanto enumerarse usando el ensayo Elispot de células B. La cantidad de células específicas de plasma refleja la frecuencia de células B de memoria en el inicio del cultivo.

En resumen, las células de plasma generadas *in vitro* se incuban en placas de cultivo revestidas con antígeno. Las células de plasma específicas para antígeno forman puntos antígeno/anticuerpo, que se detectan mediante un procedimiento inmunoenzimático convencional y se enumeran como células B de memoria.

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

El estudio muestra que el adyuvante C puede ser capaz de aliviar los problemas conocidos del refuerzo de PS3 (véase 5º Simposio Internacional de Neumococos y Enfermedades de Neumococos, 2-6 de abril 2006, Alice Springs, Australia Central. Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p. 245, PO10.06).

Ejemplo 6, eficacia de pneumolisina destoxificada (dPly) como vehículo proteico para potenciar la inmunogenicidad de PS 19F en ratones Balb/c jóvenes.

Se inmunizaron grupos de 40 hembras de ratones Balb/c (4 semanas de edad) por vía intramuscular en los días 0, 14 y 28 con 50 µl de PS sencillo 4-valente o PS conjugado con dPly 4-valente, ambos mezclados con adyuvante C. Las dos formulaciones de vacuna estaban constituidas por 0,1 µg (cantidad de sacárido) de cada uno de los siguientes PS: PS8, PS12F, PS19F y PS22F.

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

La respuesta anti-PS19F, mostrada como un ejemplo en la Figura 3, se potenció fuertemente en ratones a los que se había dado conjugados de dPly 4-valentes en comparación con los ratones inmunizados con el PS sencillo. La misma mejora se observó para las respuestas de IgG anti-PS8, 12F y 22F (no se muestran los datos).

Ejemplo 7, eficacia de proteína D con tríada de histidina de neumococos (PhtD) como un vehículo proteico para potenciar la inmunogenicidad de PS 22F en ratones Balb/c jóvenes.

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

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

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

La respuesta anti-PS 22F, mostrada como un ejemplo en la Figura 4, se potenció fuertemente en ratones a los que se les dio conjugados de PhtD 4-valentes comparada con ratones inmunizados con el PS sencillo. La misma mejora se observó en las respuestas de IgG anti-PS8, 12F y 19F (no se muestran los datos).

Ejemplo 8, inmunogenicidad en ratones C57Bl ancianos de PS conjugados 13-valentes que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD

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

La formulación de vacuna 11-valente estaba constituida por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase Tabla 1 y comentario sobre la vacuna 11-valente descrito debajo de la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase Tabla 1 y comentario sobre la vacuna 13-valente descrito bajo la Tabla 2 [usando 22F directamente conjugado]).

En el grupo 2 y 4, el vehículo pneumolisina se destoxificó con tratamiento de GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los grupos 4 y 5 se usó una fusión PhtD_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó 19A a toxoide diftérico y 22F a proteína D.

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

El 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna conjugada 13-valente se mostraron inmunogénicos en ratones C57Bl viejos (Tabla 15). La respuesta inmune inducida contra los otros PS no se vio afectada de forma negativa en ratones a los que se dio la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Tabla 15, inmunogenicidad de PS en ratones C57BI viejos (después de los niveles de IgG III)

Ratones C57 Black Viejos							
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	
	11V 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C	
1	Media del reunido	19,30	20,20	24,40	12,80	12,10	13,60
3	Media del reunido	6,32	4,84	5,21	6,74	2,38	2,54
4	Media del reunido	60,9	67,1	51,4	47,4	45,5	41,1
5	Media del reunido	1,34	3,81	3,06	2,75	1,26	1,23
6B	Media del reunido	4,41	4,12	5,88	1,58	2,31	5,64
7F	Media del reunido	0,83	0,81	1,65	1,98	0,89	0,99
9V	Media del reunido	13,8	23,7	20,0	13,1	15,5	9,6
14	Media del reunido	25,73	42,96	34,12	32,53	23,97	15,60
18C	Media del reunido	13,4	20,1	11,9	9,1	8,3	8,4
19F	Media del reunido	57,5	90,0	63,8	36,5	47,0	69,1
23F	Media del reunido	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC IC %suero	0,06 0,04-0,1 33 %	0,09 0,05-0,14 47 %	0,25 0,15-0,41 83 %	0,08 0,06-0,12 53 %	0,23 0,14-0,38 80 %	0,19 0,09-0,3 73 %
22F	GMC IC %suero	NR 0 %	5,81 3,2-10,6 97 %	3,76 1,8-7,9 90 % 90 %	0,54 0,3-1,1 77 %	0,85 0,4-1,7 87 %	2,02 1,2-3,4 97 %

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

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

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

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

Los 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna conjugada 13-valente se mostraron inmunogénicos en ratones Balb/c jóvenes (Tabla 16). La respuesta inmune inducida contra los otros PS no se vio afectada de forma negativa en ratones a los que se dio la formulación de vacuna 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Tabla 16, inmunogenicidad de PS en ratones Balb/c jóvenes (niveles de IgG post-III)

Ratones BalbC							
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	
	11V 0,1 µg/50µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19 A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C	
1	Media del reunido	131,70	101,20	83,00	82,40	67,90	85,50
3	Media del reunido	21,85	10,38	12,53	8,83	8,73	14,98
4	Media del reunido	147,4	127,0	104,4	95,0	113,6	114,2
5	Media del reunido	21,38	20,29	18,26	18,95	18,02	23,04
6B	Media del reunido	1,97	4,76	3,72	2,35	1,43	1,05
7F	Media del reunido	7,69	4,58	4,77	4,24	3,92	3,94
9V	Media del reunido	30,1	30,7	26,5	21,4	23,4	28,3
14	Media del reunido	28,78	27,67	26,23	21,54	24,34	13,73

(continuación)

Ratones BalbC							
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	
	11V 0,1 µg/50µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19 A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C	
18C	Media del reunido	53,4	52,37	46,5	57,8	47,8	75,8
19F	Media del reunido	186,6	157,7	169,3	178,9	181,9	223,2
23F	Media del reunido	4,98	3,9	5,11	0,57	3,13	4,57
19A	GMC IC %suero	0,4 0,2-0,6 93 %	32,8 26,4-40,7 100 %	25,1 20,6-30,6 100 %	21,6 17,5-26,7 100 %	18,9 15,1-23,5 100 %	23,5 19,5-28,5 100 %
22F	GMC IC %suero	NR 0%	3,99 1,9-8,42 93 %	3,76 1,8-8 100 %	6,27 3,8-10,4 100%	8,70 5,4-13,9 100%	18,76 15,2-23,1 100%

Ejemplo 10, Inmunogenicidad en Cobayas de PS conjugados 13-valentes que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD

- 5 Se inmunizaron grupos de 20 cobayas jóvenes (Cepa Hartley; 5 semanas de edad) por vía intramuscular en los días 0, 14 y 28 con 125 µl de PS conjugados 11-valentes o PS conjugados 13-valentes, ambos mezclados con adyuvante C (véase a continuación).

10 La formulación de vacuna 11-valente estaba constituida por 0,25 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase Tabla 1 y comentario sobre la vacuna 11-valente descrito debajo de la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS 19A-dPly y PS 22F-PhtD (véase Tabla 1 y comentario sobre la vacuna 13-valente descrita bajo la Tabla 2 [usando 22F directamente conjugado]). En el grupo 2 y 4, el vehículo de pneumolisina se detoxificó con tratamiento de GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los grupos 4 y 5 se usó una fusión PhtD_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó 19A con toxoide diftérico y 22F a proteína D.

15 Los niveles de IgG de ELISA anti-PS19A y 22F se dosificaron en sueros de individuos recogidos en el día 42. La respuesta de IgG de ELISA generada para los otros PS se midió en sueros reunidos.

Tabla 17, inmunogenicidad de PS en ratones Balb/c jóvenes (niveles de IgG post-III)

Cobayas							
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	
	11V 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19 A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C	
1	Media del reunido	78,00	77,21	76,15	68,77	68,59	81,04
3	Media del reunido	7,75	9,31	12,73	7,94	4,75	9,59
4	Media del reunido	130,7	94,4	132,6	166,8	85,0	101,3
5	Media del reunido	109,10	117,10	110,70	158,40	74,10	100,40
6B	Media del reunido	3,14	4,26	14,4	7,63	6,3	7,52
7F	Media del reunido	154,2	216,0	240,0	181,0	142,0	179,1
9V	Media del reunido	90,69	105,45	98,20	93,45	54,12	73,05
14	Media del reunido	71,19	77,18	46,53	59,67	38,47	53,69
18C	Media del reunido	109,4	122,3	137,1	79,9	73,7	83,1
19F	Media del reunido	73,9	102,5	112,2	75,5	62,3	72,1
23F	Media del reunido	19,19	30,74	29,44	31,52	19,13	24,94
19A	GMC IC %suero	0,4 0,24-0,68 75 %	25,58 12-54,5 100 %	41,49 24,4-70,5 100 %	14,25 5,9-34,6 100 %	27,49 16,6-45,4 100 %	6,74 4-11,3 100 %
22F	GMC IC %suero	0,12 0,09-0,16 10 %	2,51 0,94-6,73 95 %	3,67 1,59-8,42 95 %	45,74 29,3-71,4 100 %	30,68 17-53,3 100 %	96,38 73,5-126,4 100 %

Ejemplo 11: Formulaciones preparadas y ensayadas

a) Las siguientes formulaciones se preparan (usando la vacuna 13-valente de la Tabla 1 y el serotipo 3 de la tabla 5 – véase el comentario sobre la vacuna 14-valente descrito debajo de la Tabla 2 [usando 22F directamente conjugado o a través de un engarce ADH]). Los sacáridos se formulan con fosfato de aluminio y 3D-MPL como se muestra a continuación.

5

14V <u>25 µg MPL</u>						14V <u>10 µg MPL</u>					
Suma del contenido de Aluminio BAC → FF						Suma del contenido de Aluminio BAC → FF					
<u>Por Dosis:</u>						<u>Por Dosis:</u>					
PS	vehículo	µg de PS	µg de MPL	proporción de PS/Al 1/x	µg de Al	PS	vehículo	µg de PS	µg de MPL	proporción de PS/Al 1/x	µg de Al
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT _{AH}	3		15	45	18C	TT _{AH}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30	22F	PhtD	3		10	30
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100	BAC MPL 50/200			10	4	40
Contenido de aluminio FF				Suma =	355	Contenido de aluminio FF				Suma =	295

b) La misma formulación de sacáridos se potencia con cada uno de los siguientes adyuvantes:

- En la Tabla a continuación en este documento, se muestra la concentración de los componentes de emulsión por dosis de 500 µl.

Ingredientes	Adyuvante A1 250 µl emulsión ac/ag	Adyuvante A2 125 µl emulsión ac/ag	Adyuvante A3 50 µl emulsión ac/ag	
alfa Tocoferol	11,88 mg	5,94 mg	2,38 mg	
Escualeno	10,7 mg	5,35 mg	2,14 mg	
Tween 80	4,85 mg	2,43 mg	0,97 mg	
Ingredientes	Adyuvante A4 250 µl emulsión ac/ag	Adyuvante A5 250 µl emulsión ac/ag	Adyuvante A6 125 µl emulsión ac/ag	Adyuvante A7 50 µl emulsión ac/ag

10

alfa Tocoferol	11,88 mg	11,88 mg	5,94 mg	2,38 mg
Escualeno	10,7 mg	10,7 mg	5,35 mg	2,14 mg
Tween 80	4,85 mg	4,85 mg	2,43 mg	0,97 mg
3D-MPL	50 µg	25 µg	25 µg	10 µg

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

Composición del adyuvante B1

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

- 5 Liposomas:
 - DOPC 1 mg
 -colesterol 0,25 mg
- 10 3DMPL 50 µg
 QS21 50 µg
 Tampón KH_2PO_4 3,124 mg
 Tampón Na_2HPO_4 0,290 mg
 NaCl 2,922 mg
 (100 mM)
 WFI c.s. a 0,5 ml de Disolvente
 pH 6,1
 1. concentración de PO_4 Total = 50 mM

Composición del adyuvante B2

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

- Liposomas:
- 20 -DOPC 0,5 mg
 -colesterol 0,125 mg
- 25 3DMPL 25 µg
 QS21 25 µg
 Tampón KH_2PO_4 3,124 mg
 Tampón Na_2HPO_4 0,290 mg
 NaCl 2,922 mg
 (100 mM)
 WFI c.s. a 0,5 ml de Disolvente
 pH 6,1

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

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

Emulsión de aceite en agua 50 µl

- 35 - escualeno 2,136 mg
 - α -tocoferol 2,372 mg
 - Tween 80 0,97 mg
 - colesterol 0,1 mg
- 40 3DMPL 50 µg
 QS21 50 µg
 KH_2PO_4 0,470 mg de Tampón
 Na_2HPO_4 0,219 mg de Tampón
 NaCl 4,003 mg
 (137 mM)
 KCl 0,101 mg
 (2,7 mM)
 45 WFI c.s. a 0,5 ml de Disolvente
 pH 6,8

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

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

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

Se compararon dos formulaciones, constituidas por 22F-Phtd preparada por química CDAP directa o 22F-AH-PhtD (PS derivatizado con ADH). Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario debajo de la Tabla 2 para las características de la vacuna 13-valente hecha con 22F conjugado directamente o mediante un espaciador de ADH. Las formulaciones de vacuna se suplementaron con adyuvante C.

Se midieron los niveles de IgG ELISA anti-PS22F y los títulos de opsono-fagocitosis en el suero recogido en el día 42.

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

Ejemplo 13, impacto de nuevos adyuvantes sobre la inmunogenicidad de conjugados de PS de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae*

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

Se conjugó PS 18C con el toxoide tetánico, 19F con el toxoide diftérico, 19A con Ply destoxificado con formol, 22F con PhtD y los otros PS con PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario debajo de la Tabla 2 para las características de la vacuna 13-valente hecha con 22F conjugado directamente.

Se compararon cuatro formulaciones, suplementadas con AlPO₄, adyuvante A1, adyuvante A4 o adyuvante A5.

Se midieron los niveles de IgG ELISA anti-PS, Ply, PhtD y PD en el suero recogido en el día 42 y se agruparon por grupos. Se calculó la siguiente proporción para cada antígeno: nivel de IgG inducido con el nuevo adyuvante analizado / nivel de IgG inducido con AlPO₄.

Todos los nuevos adyuvantes analizados mejoraron al menos 2 veces las respuestas inmunes a los conjugados 13-valentes comparados con la formulación de AlPO₄ clásica (figura 7).

Ejemplo 14, Eficacia protectora de un conjunto de PhtD/Ply destoxificado en un modelo de neumonía de mono de neumococos

Se inmunizaron intramuscularmente grupos de 6 monos Rhesus (3 a 8 años de edad), seleccionados como los que tienen los niveles de anticuerpos anti-19F preexistentes más bajos, en los días 0 y 28 con conjugados de PS 11-valentes (es decir, 1 µg de PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F, y 3 µg de PS 4, 18C y 19F [de sacárido]) o PhtD (10 µg) + Ply destoxificado con formol (10 µg) o el adyuvante solo.

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

Se inocularon neumococos tipo 19F (5 x 10⁸ ufc) en el pulmón derecho en el día 42. Se contaron las colonias en lavados bronco-alveolares recogidos en los días 1, 3 y 7 después de la estimulación. Los resultados se expresaron como el número de animales por grupo muertos, con el pulmón colonizado o despejado en el día 7 después de la estimulación.

Como se muestra en la figura 8, se obtuvo una protección buena cercana a la significación estadística (a pesar del bajo número de animales usados) con los conjugados 11-valentes y el conjunto PhtD+Plyd (p < 0,12, ensayo Fisher Exact) comparados con el grupo del adyuvante solo.

Ejemplo 15, impacto de la química de conjugación sobre la respuesta del anticuerpo anti-PhtD y la eficacia protectora frente a una estimulación tipo 4 inducida por conjugados de 22F-PhtD

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

Se midieron los niveles de IgG ELISA anti-PhtD en el suero recogido en el día 27.

Se estimularon los ratones de forma intranasal con 5 x 10⁶ ufc de neumococo tipo 4 en el día 28 (es decir, un serotipo de neumococos no cubierto potencialmente por el PS presente en la formulación de vacuna analizada). La mortalidad inducida se controló hasta el día 8 después de la estimulación.

El 22F-AH-PhtD indujo una respuesta de IgG anti-PhtD más alta de forma significativa y una mejor protección frente a la estimulación tipo 4 que 22F-PhtD.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica para lactantes que comprende una vacuna multivalente contra *Streptococcus pneumoniae* que comprende conjugados de sacárido capsular de diferentes serotipos, en la que la composición comprende un conjugado de sacárido del serotipo 22F, en la que los sacáridos capsulares presentes en la composición inmunogénica están conjugados con un vehículo proteico seleccionado independientemente del grupo que consiste en Toxoide Tetánico (TT), Toxoide Diftérico (DT), CRM197, fragmento C de TT, PhtD, fusiones de PhtDE, pneumolisina destoxificada y proteína D en la que la composición comprende además conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 23F y en la que la composición inmunogénica comprende al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con PhtD mediante un engarce.
- 10 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que 2 vehículos proteicos diferentes están conjugados de forma separada con al menos 2 serotipos de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* diferentes.
3. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende un conjugado de sacárido 22F, en la que la proporción de vehículo proteico a sacárido 22F está entre 5:1 y 1:5, 4:1 y 1:1 o 2:1 y 1:1 (p/p).
- 15 4. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que comprende un conjugado de sacárido 22F, en la que el tamaño medio del sacárido 22F está por encima de 100 kDa.
5. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que comprende además una o más proteínas de *S. pneumoniae* no conjugadas o conjugadas.
- 20 6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que dichas una o más proteínas de *S. pneumoniae* son seleccionadas entre la familia de la Tríada de polihistidina (PhtX), la familia de la proteína de unión a colina (CbpX), truncamientos de CbpX, familia LytX, truncamientos de LytX, proteínas quiméricas de truncamiento de CbpX-truncamiento de LytX, pneumolisina destoxificada (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
7. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además un adyuvante.
- 25 8. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Un procedimiento para fabricar la vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. Un uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1 a 7, o la vacuna de la reivindicación 8, en la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección por *Streptococcus pneumoniae*.

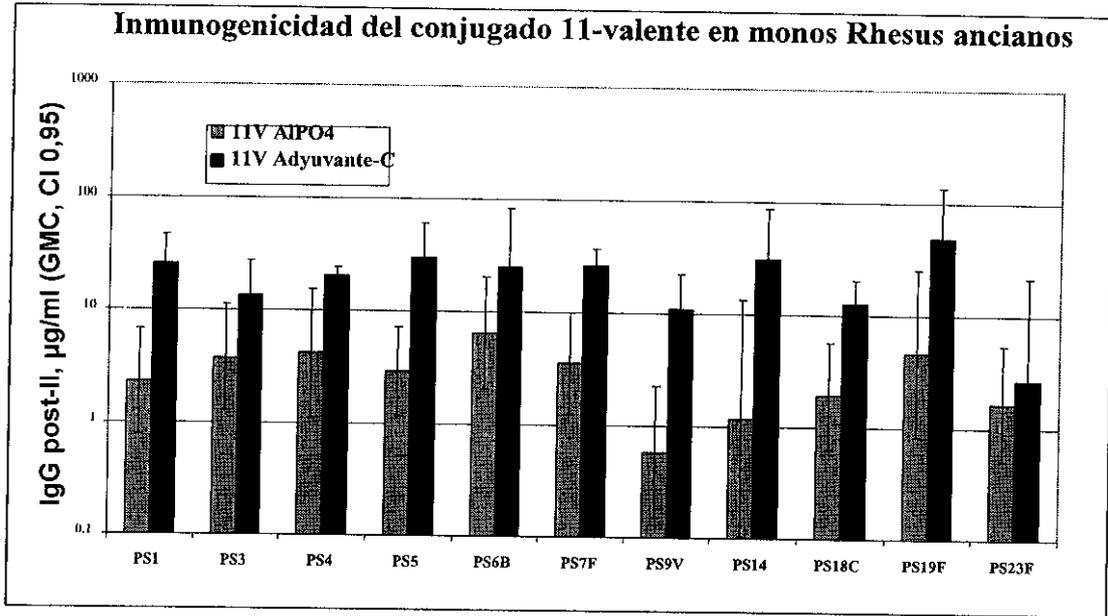


Figura 1, Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus ancianos (niveles de IgG anti-PS post-II)

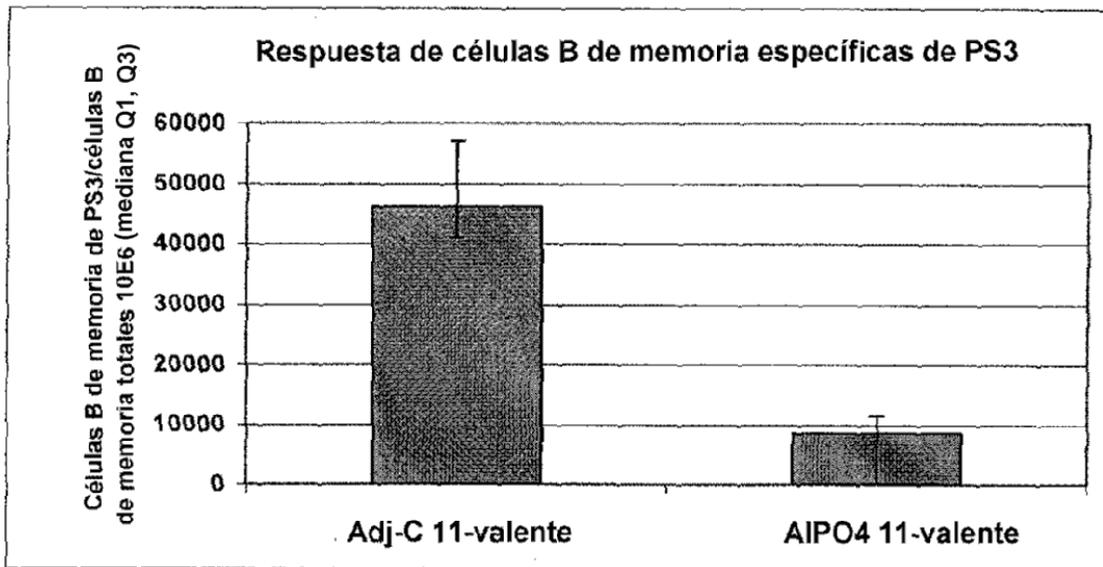


Figura 2, Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus ancianos (frecuencias de células B de memoria anti-PS3 post-II)

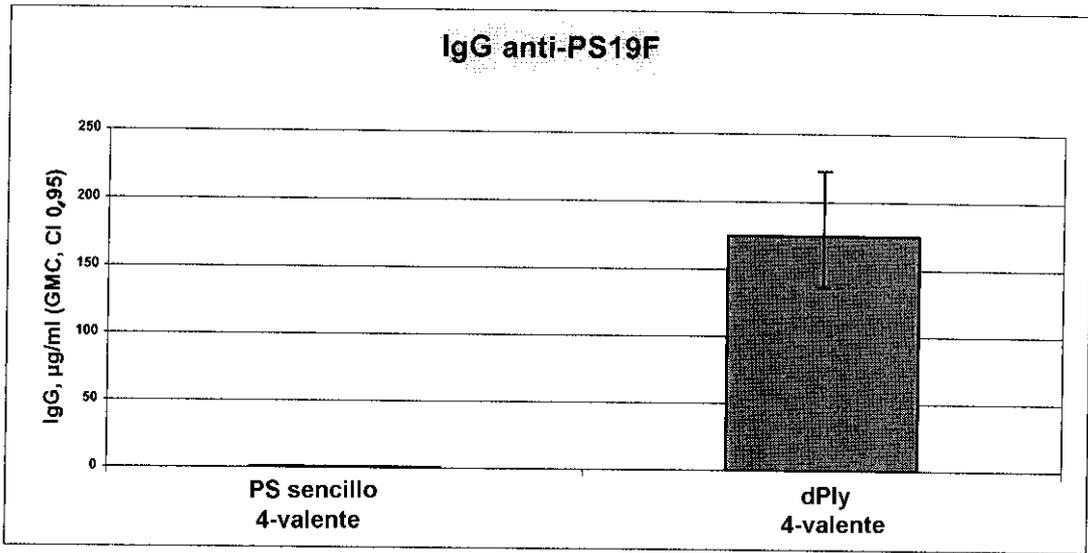


Figura 3, Inmunogenicidad de PS19F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III)

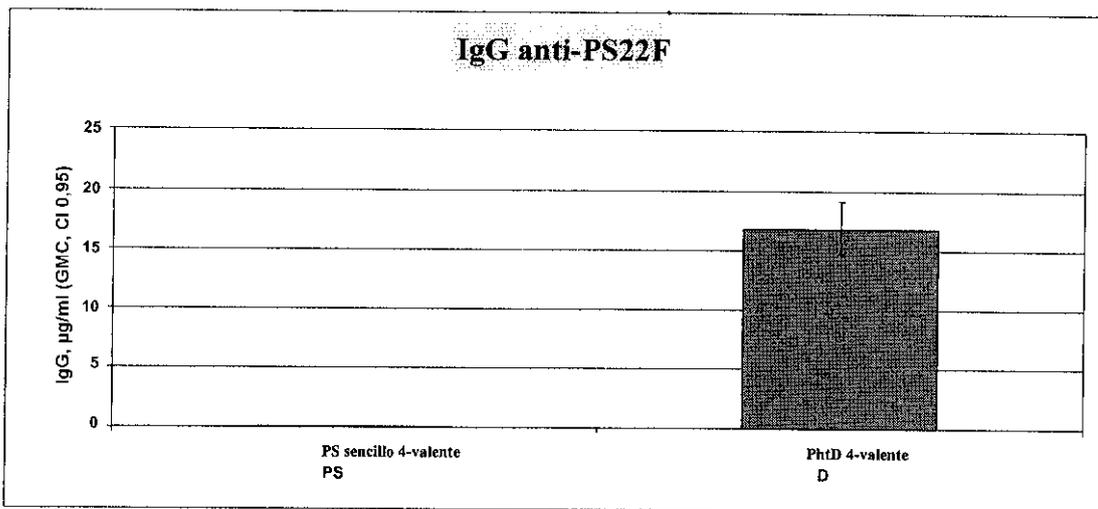


Figura 4, Inmunogenicidad de PS22F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III)

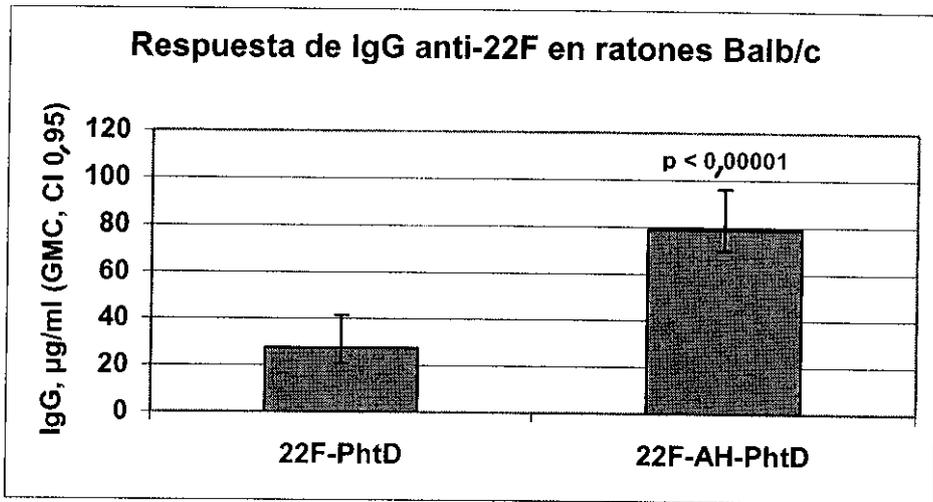


Figura 5, niveles de anticuerpos IgG anti-PS en suero

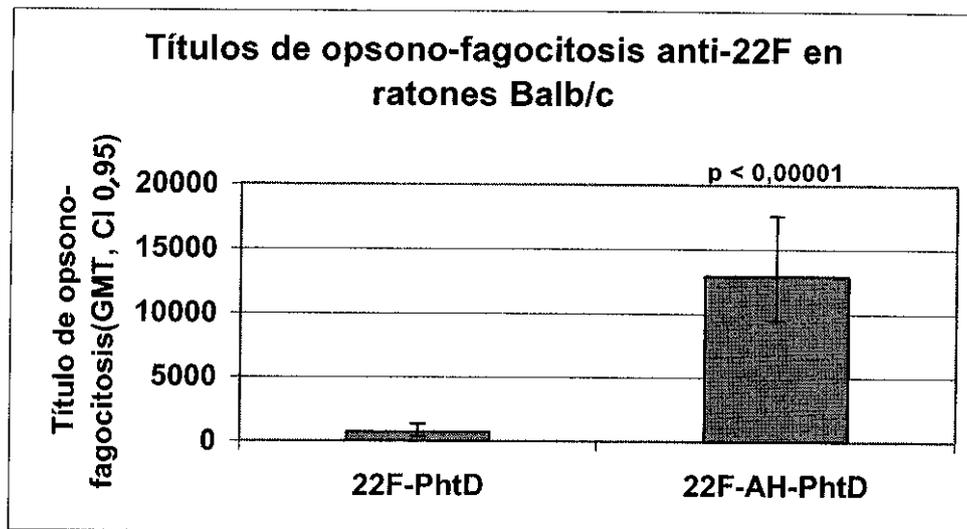


Figura 6, títulos de opsono-fagocitosis

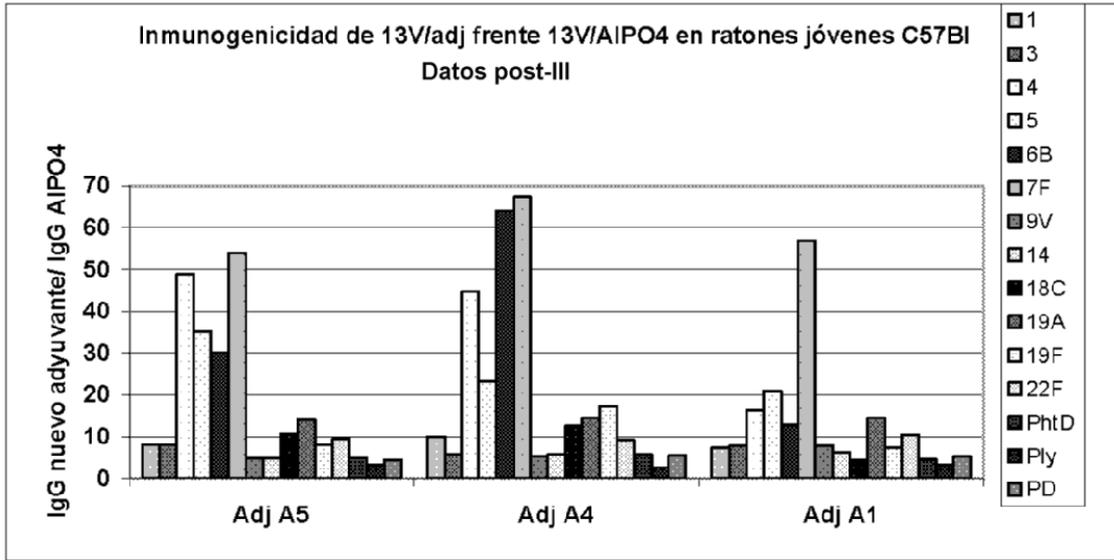


Figura 7, Comparación de las respuestas de IgG inducidas con nuevos adyuvantes con la respuesta provocada con AIPO₄

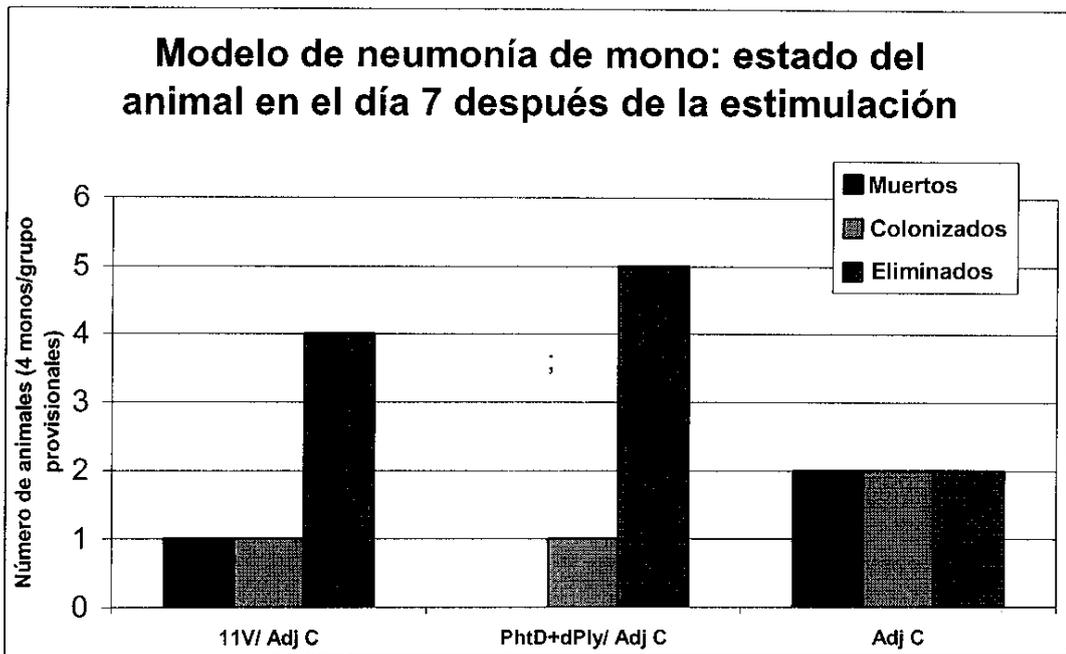


Figura 8, eficacia protectora del conjunto de proteínas PhtD + Plyd frente a la colonización del pulmón tipo 19F en monos Rhesus

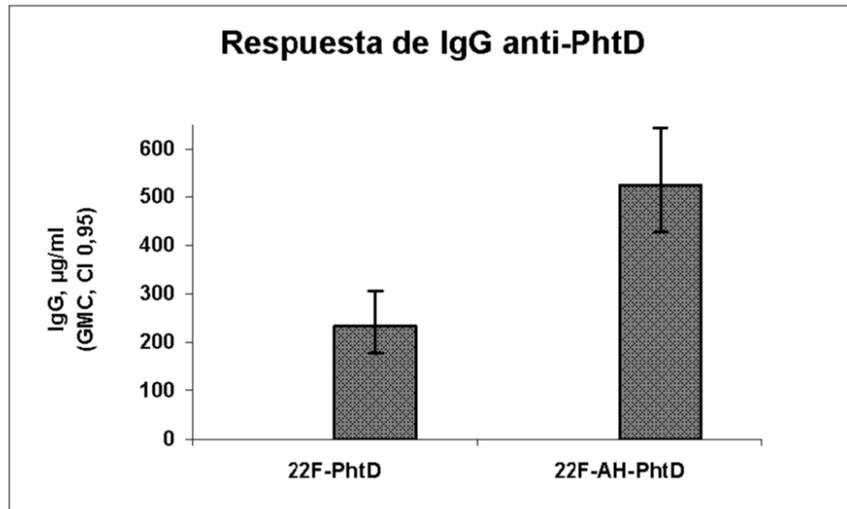


Figura 9, respuesta de IgG anti-PhtD en suero

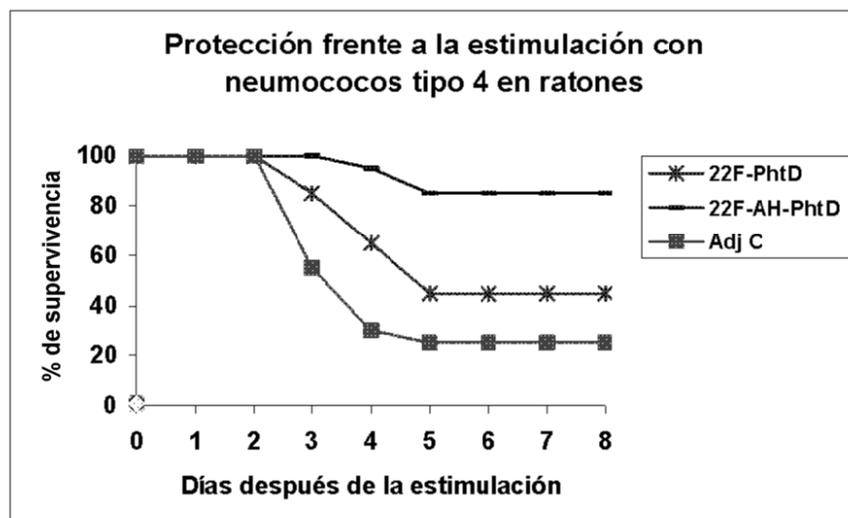


Figura 10

Protección frente a la estimulación con neumococos tipo 4 en ratones