

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 249**

51 Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2004 E 04739897 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1638597**

54 Título: **Péptidos polianiónicos para estabilización de vacunas**

30 Prioridad:

16.06.2003 GB 0313916

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

09.07.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GARCON, NATHALIE MARIE-JOSEPHE;
LEMOINE, DOMINIQUE y
WAUTERS, FLORENCE EMILIE JEANNE
FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 540 249 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

Péptidos polianiónicos para estabilización de vacunas

La presente invención se refiere al campo de las vacunas y, en particular, a composiciones inmunógenas que comprenden antígenos de punto isoelectrico bajo tales como polisacáridos u oligosacáridos capsulares de *H. influenzae* B (PRP). La presente invención presenta composiciones inmunógenas y vacunas de combinación que comprenden PRP, en las que el PRP está protegido en alguna medida de la interferencia inmunitaria que puede aparecer cuando se combina el PRP con otras formulaciones antigénicas (particularmente formulaciones que comprenden DTPa; una vacuna de combinación 'trivalente' bien conocida que comprende toxoide de la difteria, (DT), toxoide del tétanos (TT) y componentes de *B. pertussis* no celulares [que comprende típicamente toxoide de la tos ferina detoxificado (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinógenos 2 y 3], típicamente adsorbidos (al menos en parte) en coadyuvante de hidróxido de aluminio, por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa™ (GlaxoSmith- Kline Biologicals) que contiene antígenos DT, TT, PT, FHA y PRN, todos adsorbidos en coadyuvante de hidróxido de aluminio). También se presenta un procedimiento para reducir la interferencia de PRP en una vacuna de combinación (que comprende, por ejemplo, DTPa).

Las vacunas que usan polisacáridos se conocen en la técnica. Por ejemplo, una vacuna de PRP para la prevención de infecciones por *Haemophilus influenzae* B se basa en el oligosacárido o el polisacárido capsular de *H. influenzae* B (PRP) conjugado con una proteína vehículo. El polisacárido es un polímero de ribosa, ribitol y fosfato. Los ejemplos de proteína vehículo incluyen toxoide de la difteria o del tétano, o una proteína de membrana exterior de *N. meningitidis*. Véanse, por ejemplo, los documentos US 4.365.170, US 4.673.574, EP 208375, EP 477508 y EP 161188.

Es deseable administrar dichas vacunas de conjugados con otros antígenos o vacunas al mismo tiempo y esto puede involucrar múltiples inyecciones. Los problemas asociados con múltiples inyecciones incluyen un procedimiento de administración más complicado y un volumen de inyección total más grande. Este es un problema particularmente agudo cuando la vacuna se pretende para niños pequeños. Tanto para el niño como para el practicante es deseable inyectar todos los antígenos necesarios en una sola carga de volumen normal, haciendo que, de este modo, el procedimiento de vacunación sea menos traumático y menos doloroso para el niño, y más eficaz y más sencillo de gestionar por parte del practicante.

Se ha propuesto, por lo tanto, combinar dichas vacunas de conjugados de polisacáridos con otras vacunas tales como DTPa o DTPw (en las que el componente de tos ferina es *Bordetella pertussis* de célula completa inactivado) para producir vacunas de combinación más elaboradas. Además, también se ha propuesto la inclusión de antígenos adicionales a dicha vacuna de combinación para la prevención de enfermedades tales como la hepatitis B o la polio (vacunas de combinación que comprenden un antígeno contra la hepatitis B y antígenos contra la difteria, el tétanos y la tos ferina (HepB, DTPa) se han descrito en el documento WO 93/24148). Véase también el documento WO 98/00167 y el documento WO 99/13906 que también divulgan vacunas de combinación DTP-PRP.

Se ha hallado, no obstante, que un mezclado sencillo de los componentes de una vacuna de combinación es complicado por el hecho de que no todos los antígenos pueden mezclarse eficazmente entre sí. La reducción de la inmunogenicidad de un antígeno cuando se combina con otros componentes (en comparación con el antígeno particular administrado solo) es conocida como interferencia. Se sabe, por ejemplo, que el mezclado extemporáneo de una vacuna de combinación DTPa con conjugados PRP sin coadyuvar tiene como consecuencia una reducción de valoraciones de anticuerpos con respecto al polisacárido PRP (documento WO 97/00697). Además, el documento WO 97/00697 muestra que si el conjugado PRP se adsorbe en hidróxido de aluminio existe una reducción significativa de valoraciones de anticuerpos con respecto al componente polisacárido. Estos resultados indicaron que había interferencia entre el hidróxido de aluminio de la vacuna DTPa y el PRP. Para tratar de minimizar esta interferencia en dicha vacuna de combinación preparada extemporáneamente, el PRP se adsorbió previamente en fosfato de aluminio.

Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se piensa que el problema de interferencia anterior puede ser el resultado de que el PRP (con un punto isoelectrico bajo inferior a 2) forme una interacción fuerte con el hidróxido de aluminio (con un punto isoelectrico alto). Esta interacción puede enmascarar epítopes de células inmunocompetentes (particularmente si la interacción PRP/AIOH forma una red de partículas), un fenómeno denominado floculación (véase la figura 5) que puede observarse visualmente o mediante microscopio óptico.

El documento WO 96/37222 también describe el problema de interferencia. En este caso la antigenicidad del conjugado de PRP se estabiliza mediante la adsorción del mismo y los otros componentes DTPa en un coadyuvante basado en aluminio con una carga de punto cero (ZPC) inferior a 7,2, por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio al que se han añadido sales aniónicas para reducir su carga de punto cero de aproximadamente 10 o 11 a menos de 7,2.

Un problema con el uso de fosfato de aluminio exclusivamente para una vacuna de combinación es que muchos antígenos de una vacuna de combinación se benefician inmunológicamente al ser adsorbidos en hidróxido de aluminio (por ejemplo pertactina). Muchos de estos antígenos (por ejemplo pertactina) no pueden adsorberse

adecuadamente en fosfato de aluminio y se desorben de hidróxido de aluminio si se añaden suficientes sales aniónicas como para reducir su carga de punto cero por debajo de 7,2. La pertactina es uno de los componentes más importantes en la vacuna de tos ferina. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, una reducción significativa de su adsorción en el coadyuvante podría provocar una reducción de la respuesta de linfocitos T y de la potencia de la vacuna de tos ferina no celular como un todo. A pH 6,1 (el pH típico de vacunas DTPa) una etapa de adsorción de 24 horas permite que más del 90 % de la pertactina se adsorba en hidróxido de aluminio, pero que menos del 50 % se adsorba en fosfato de aluminio (valor adicionalmente reducido cuando se combina con otros antígenos).

Por lo tanto, existe un problema técnico en vacunas de combinación que comprenden PRP y antígenos adsorbidos en hidróxido de aluminio para reducir la interferencia con el PRP, manteniendo aún un grado significativo de adsorción de antígenos asociado de forma beneficiosa con hidróxido de aluminio. Otro problema técnico es que los antígenos de pl bajo pueden formar agregados (o floculados) con partículas de coadyuvante que hacen que la vacuna sea inadecuada para su uso.

El documento WO 99/48525 proporciona una solución a este problema que implica un proceso complejo de adsorción y mezclado de antígenos para añadir el PRP con una interferencia minimizada.

Existe aún la necesidad, no obstante, de soluciones adicionales a los problemas anteriores que sean ventajosamente más sencillas (es decir, que impliquen una sola etapa de proceso adicional sencilla o que impliquen una sola adición de un excipiente protector de PRP a la composición inmunógena). La presente invención proporciona dicha solución.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento general mediante el que pueden fabricarse vacunas de combinación PRP/DTPa (o PRP/DTPw) bien preparadas extemporáneamente o bien líquidas para reducir el problema de interferencia de PRP mientras es capaz de mantener un grado significativo de adsorción de antígenos asociado de forma beneficiosa con el coadyuvante basado en aluminio en el que sean más inmunógenos. Al hacerlo de este modo, los antígenos de la tos ferina en vacunas de combinación de la presente invención pueden mantenerse de forma estable en su forma más potente. La invención también proporciona composiciones inmunógenas, vacunas y vacunas de combinación que comprenden PRP que está protegido en alguna medida de interferencia inmunitaria. Los inventores han hallado que lo anterior puede lograrse, sorprendentemente, incorporando un excipiente de polímero polianiónico con la vacuna que comprende el PRP, en la que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspartico y/o de ácido L-glutámico. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, el polímero polianiónico puede competir con el PRP, protegiéndolo de cualquier hidróxido de aluminio presente en la vacuna (por ejemplo reduciendo la cantidad o la velocidad de unión de PRP al coadyuvante y/o la medida o la velocidad de la floculación) y sorprendentemente no provoca que los antígenos ya adsorbidos al hidróxido de aluminio se desorban significativamente.

Según una realización, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un polisacárido u un oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP) y un polímero polianiónico, en la que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas del grupo que consiste en: ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspartico y/o de ácido L-glutámico.

Aunque es el PRP el que se describe a lo largo de la presente memoria descriptiva, se espera que la misma solución pueda proteger otros oligosacáridos o polisacáridos con un punto isoeléctrico bajo (inferior a 3, preferentemente inferior a 2) y, por lo tanto, cuando se mencione el PRP en el presente documento, pueden incluirse alternativamente como parte de la invención dichos otros oligosacáridos o polisacáridos. El punto isoeléctrico (pI) anterior es el del resto sacárido antes de algún evento de conjugación. En particular, se pueden usar alternativamente polisacáridos u oligosacáridos capsulares aislados de *N. meningitidis* serogrupo A o C, funcionando el polímero polianiónico de modo que evite, por ejemplo, eventos potenciales de reducción de la agregación y/o la inmunogenicidad en las vacunas (por ejemplo basadas en combinaciones de DTPa o DTPw) de la invención (véase el ejemplo 2). Por lo tanto, se prevé una composición inmunógena que comprende un antígeno sacárido con un pI inferior a 3 y un polímero polianiónico, en la que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspartico y/o de ácido L-glutámico.

Por "oligosacárido" y "polisacárido" se quiere decir un epítipo de sacárido que se ha aislado de un patógeno (por ejemplo de un polisacárido capsular de una célula bacteriana). Puede aislarse directamente de la bacteria o puede procesarse de algún modo antes de su uso en las vacunas de la invención, por ejemplo puede reducirse su tamaño

por técnicas conocidas tales como microfluidización (véase el documento EP 497524 para otras de dichas técnicas de reducción de tamaño). Los términos "polisacárido" u "oligosacárido" a lo largo de la presente memoria descriptiva pueden reemplazarse por el término "sacárido".

5 Por "protección" de un antígeno con bajo pl de coadyuvantes con alto pl (tal como AIOH) se quiere decir cualquiera de los puntos siguientes, o todos los mismos: a) que el antígeno muestre una unión reducida al coadyuvante si el polímero polianiónico está presente y/o b) que la floculación entre el antígeno y el coadyuvante esté reducida (preferentemente se evite) si el polímero polianiónico (por ejemplo, evaluado usando técnicas de microscopía óptica en el ejemplo 2, las figuras 8 y 11 que presentan muestras floculadas, y las figuras 7, 9, 10, 12 que presentan muestras no floculadas) está presente y/o c) la interferencia inmunitaria con el antígeno está reducida (y preferentemente se evita) si el polímero polianiónico está presente (medido por ensayos ELISA para establecer GMT o GMC de anticuerpo antiantígeno en sueros de animales inmunizados).

Se pretende que los términos "comprendiendo", "comprender" y "comprende" en el presente documento puedan sustituirse con los términos "constituido por", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

15 En una realización preferente, el PRP (o antígeno sacárido con un pl inferior a 3) está conjugado con una proteína vehículo que es una fuente de epítomos de linfocito T colaborador.

Las proteínas vehículo preferentes para los conjugados de polisacáridos u oligosacáridos de la presente invención son el toxoide del tétanos, el toxoide de la difteria, CRM197, una proteína de membrana exterior de una bacteria tal como *N. meningitidis* y una proteína D de *H. influenzae* no tipificable (documento EP594610). Del modo más preferente, el PRP (u otro antígeno de sacárido con un pl inferior a 3) está conjugado al toxoide del tétanos. La síntesis del conjugado de polisacárido capsular *Haemophilus influenzae* tipo B (PRP)-toxoide del tétano (TT) se describe, por ejemplo, en el documento WO 97/00697.

20 Los conjugados de polisacáridos u oligosacáridos de uso en la invención pueden prepararse mediante cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo, el polisacárido puede acoplarse mediante un enlace tioéter. Este procedimiento de conjugación se basa en la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse así directamente o por medio de un grupo espaciador a un grupo amino de la proteína vehículo. Preferentemente, el éster de cianato se acopla con hexanodiamina y el polisacárido derivado de amino se conjuga a la proteína vehículo usando química de heterounión que implica la formación del enlace tioéter. Dichos conjugados se describen en la solicitud publicada PCT WO93/15760 (Universidad de los Servicios Uniformados).

30 Los conjugados se pueden preparar también por procedimientos de aminación reductora directos tal como se describe en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP 161188, EP 208375 y EP 477508.

Un procedimiento adicional implica el acoplamiento de un polisacárido activado con bromuro de cianógeno (o CDAP) derivado con hidrazida de ácido adípico (ADH) al vehículo proteico por condensación de carbodiimida. Dicha conjugación se describe en Chu C. y col. *Infec. Immunity*, 1983 245 256.

35 El polímero polianiónico para su uso en la presente invención es un polímero que, cuando se disuelve en un medio acuoso a pH 7 (y preferentemente también a pH 6,1 (un pH típico de vacunas DTPa y DTPw de la invención), está cargado negativamente debido a la presencia de unidades de repetición constitucionales aniónicas. Una unidad de repetición constitucional o monómero se refiere a la unidad estructural mínima de un polímero. El polímero polianiónico puede ser un heteropolímero polianiónico que comprende dos o más unidades de repetición constitucionales aniónicas diferentes, o puede ser un homopolímero polianiónico que consiste en una única unidad de repetición constitucional aniónica. Aunque es preferente, claramente no todos los monómeros/las unidades de repetición deben estar cargadas negativamente siempre que existe una carga negativa suficiente en el polímero polianiónico de la invención para que proporcione las prestaciones indicadas en el presente documento, en particular la capacidad de evitar la floculación entre el PRP y el coadyuvante de hidróxido de aluminio y/o la capacidad de no desorber significativamente antígenos adsorbidos, de forma beneficiosa, en hidróxido de aluminio.

40 El polímero polianiónico para su uso en la invención es un oligopéptido o un polipéptido. Dichos péptidos pueden ser D- o L-péptidos (preferentemente los últimos, de modo que el péptido sea ventajosamente biodegradable). Para los fines de la presente invención, el polímero polianiónico de uso en la presente invención es un oligopéptido o un polipéptido que tiene un contenido en monómeros no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o, preferentemente, al 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico.

45 El polímero polianiónico de uso en la invención consiste en, en promedio, 8-117 monómeros, más preferentemente 15-32 o 15-18 monómeros, del modo más preferente 17 monómeros (o residuos en el caso de péptidos). Ya que los polímeros son poblaciones complejas de moléculas de longitudes potencialmente diferentes, "en promedio" significa que el número de monómeros o residuos se calcula según el peso molecular promedio en peso (o M_w) del polímero polianiónico medido por MALLS dividido por el peso molecular del monómero. Preferentemente, la polidispersidad (una medida de la homogeneidad) del polímero polianiónico es inferior a 3. La dispersión de luz láser a múltiples ángulos (MALLS) es una técnica muy conocida para obtener mediciones del M_w y polidispersidad de polímeros (y se

lleva a cabo típicamente usando una columna de HPLC TSKG3000PWXL a un cuadal de 0,75 ml/min, eluido en tampón de fosfatos 10 mM, pH 7,6, NaCl 130 mM). También se prevé que el polímero polianiónico de la invención pueda comprender mezclas de 2 o más polímeros polianiónicos con diferentes M_w . Por ejemplo, pueden usarse ventajosamente para los fines de la presente invención mezclas de 16meros y 8meros o 16meros y 4meros del mismo tipo de polímero.

Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que los polímeros polianiónicos tienen ventajas sobre el uso de aniones o monómeros aniónicos, ya que los aniones tienen que estar presentes en una concentración elevada en la vacuna para evitar la unión y/o la floculación de PRP con el coadyuvante AIOH. A dichas concentraciones elevadas los antígenos adsorbidos de forma beneficiosa en el coadyuvante se desorben. Se piensa que los polímeros polianiónicos tienen las mismas propiedades de bajo pl y una afinidad de unión por AIOH, lo que permite concentraciones más reducidas de excipiente usado de forma suficiente para evitar el problema de interferencia/floculación del PRP, pero de forma insuficiente para provocar una desorción significativa o excesiva de antígenos adsorbidos de forma beneficiosa en AIOH.

En una realización particularmente preferente, el polímero polianiónico de la invención es un poli(ácido L-glutámico) (PLG). El PLG de bajo peso molecular (inferior a 6000 de M_w , preferentemente inferior a 640-5000) es particularmente preferente (por ejemplo, PLG con, en promedio, 17 residuos con un M_w de 2178) para el aclaramiento óptimo del organismo después de la administración y para asegurar que no induzca una respuesta inmunitaria por sí mismo en el huésped.

El PLG es un ácido poliamínico biodegradable con un grupo γ -carboxilo en cada unidad de repetición (pKa 4,1) y está cargado negativamente a pH 7, lo que hace que este homopolímero sea hidrosoluble y le proporciona una estructura polianiónica. El PLG puede fabricarse usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales. También está disponible de Sigma-Aldrich en una forma relativamente polidispersa (por ejemplo 17meros con una polidispersidad de aproximadamente 2,6) o de Neosystem en una forma relativamente monodispersa (por ejemplo, 8, 16, 24 o 32meros con una polidispersidad cercana a 1). Para un 17mero preferente de la invención (por ejemplo de Sigma), el PLG está típicamente preferentemente en una concentración de 290 $\mu\text{g/ml}$. Para una forma de 16mérica preferente de la invención (por ejemplo de Neosystems), el PLG está preferente típicamente en una concentración de 125-600 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente aproximadamente 300 o 400 $\mu\text{g/ml}$, aunque el experto apreciará que las cantidades anteriores pueden variar en alguna medida en función de la composición exacta de la vacuna.

El α -PLG se usa actualmente para dos aplicaciones biomédicas principales: administración de fármacos para el tratamiento de cáncer (Li y col., Clin. Cancer. Res. 6:2829-2834, 2000) y pegamento biológico (Iwata y col., Biomaterials 19:1869-1876, 1998). No se ha usado como excipiente para vacunación por vía intramuscular.

Existen varias variables en una muestra de vacuna que permiten al experto determinar la cantidad apropiada de polímero aniónico (o mezcla de polímeros aniónicos de distintos M_w) que debería usarse en una vacuna. En general, debería usarse solo el polímero polianiónico suficiente para que se evite la floculación y/o la interferencia inmunitaria de PRP. A menudo el polímero polianiónico está presente en una concentración superior en la vacuna que la del sacárido PRP. Los factores que se deben considerar cuando se determina la cantidad de polímero polianiónico que se va a usar son:

- 1) Carga del polímero polianiónico (ya que si este es más negativo, se requiere menos concentración en la muestra).
- 2) Tamaño de la cadena del polímero polianiónico (en promedio) (cuanto más grande sea, menos concentración se requerirá en la muestra).
- 3) Polidispersidad del polímero polianiónico (se requerirán mayores cantidades en caso de sesgo irregular a especies de bajo peso molecular en la muestra).
- 4) Cantidad de PRP (o antígeno sacárido de bajo pl) (esta puede ser de 1-20 $\mu\text{g/dosis/PS}$); si la cantidad aumenta, se requiere más polímero polianiónico.
- 5) Tamaño del PRP (o antígeno sacárido con un pl inferior a 3); si el tamaño aumenta de oligosacárido a polisacárido también la afinidad de unión a coadyuvante de AIOH (por ejemplo), por lo que se requiere más polímero polianiónico.
- 5) Relación de PRP(sacárido):vehículo (5:1 a 1:5 p/p); si el impedimento estérico en el conjugado aumenta, puede ser necesario ajustar las cantidades de polímero polianiónico.
- 6) Carga de coadyuvante (con una ZPC >8); si la carga aumenta al mismo pH, se necesita más polímero polianiónico.
- 7) Tamaño de la particular de coadyuvante (por ejemplo AIOH) (aunque debe ser siempre de un tamaño inyectable) para una cantidad de coadyuvante dada, si aumenta se necesitará menos polímero polianiónico.
- 8) Cantidad de coadyuvante (siendo el intervalo aceptable para vacunas de 50-1250 μg por dosis de Al^{3+}); si la cantidad aumenta se requerirá más polímero polianiónico.
- 9) Presencia de otros antígenos adsorbidos; si una cantidad superior de Ag está adsorbida en la superficie del coadyuvante, se requerirá menos polímero polianiónico.

Una evaluación de la floculación se puede llevar a cabo fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica tales como perfil de sedimentación, microscopio óptico (ejemplo 2) o incluso observación visual. En general, las vacunas de la invención que comprenden coadyuvante con una ZPC > 8 deberían estar menos agregadas (preferentemente no se observa ninguna floculación) que la formulación equivalente sin polímero polianiónico después de 15 minutos de mezclado del sacárido PRP con la vacuna. La conservación de valoraciones de anticuerpos anti-PRP (o la reducción de interferencia del desarrollo de dichas valoraciones) puede evaluarse mediante ensayos ELISA estándar.

Las composiciones inmunógenas particularmente preferentes de la invención comprenden PRP (preferentemente conjugado) y polímero polianiónico que se formulan ventajosamente de modo que el resultado de multiplicar la concentración del polímero polianiónico en la composición (en μM) por la carga negativa neta del polímero polianiónico a pH 7,0 dividido por la cantidad de PRP presente en una dosis de 0,5 ml de la composición inmunógena (en μg) es 300-6000, preferentemente 400-4000, más preferentemente 500-2000, 560-1100, 610-900, 640-800 o 660-700 y del modo más preferente aproximada o exactamente 680.

La concentración del polímero polianiónico en la composición debería medirse de nuevo según el M_w de polímero polianiónico usado, y se encuentra típicamente en el intervalo de 30-2000 μM , preferentemente 80-1000, 100-500, 150-300 y del modo más preferente aproximada o exactamente 200 μM . Como alternativo, la concentración puede expresarse en unidades de $\mu\text{g/ml}$, encontrándose típicamente en el intervalo de 45-3000 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente de 120-1500, 150-750, 225-450 y del modo más preferente aproximada o exactamente 290 o 300 $\mu\text{g/ml}$.

La carga negativa neta a pH 7,0 del polímero polianiónico puede calcularse mediante cualquier medio adecuado. De nuevo esta puede ser un valor promedio de esta propiedad del polímero y debería calcularse con respecto al M_w del polímero polimérico. Por ejemplo, un polímero PLG con, en promedio, 17 residuos debería tener una carga negativa neta de 17. Preferentemente, la carga negativa neta debería ser al menos 8, o al menos 17, preferentemente 8-106, 10-80, 12-60, 14-40, 16-20 y del modo más preferente aproximada o exactamente 17.

Es preferente que el polímero polianiónico tenga al menos en promedio 1 carga negativa neta a pH 7,0 para 3 monómeros, preferentemente al menos 2 para 3 monómeros y del modo más preferente al menos, en promedio, 1 carga negativa neta para cada monómero. Las cargas pueden disponerse irregularmente a lo largo de la longitud del polímero, pero están extendidas preferentemente de forma regular a lo largo de la longitud del polímero.

Las composiciones inmunógenas de la invención comprenden típicamente 1-20, preferentemente 2,5-10 y del modo más preferente aproximada o exactamente 5 μg de PRP (preferentemente conjugado a una proteína vehículo, cuyo peso no se cuenta en los cálculos anteriores) por 0,5 ml de dosis. El PRP, del modo más preferente, no se adsorbe intencionadamente en cualquier coadyuvante.

En una realización muy preferente se proporciona una composición inmunógena que comprende 5 μg de PRP conjugado con una proteína vehículo (preferentemente el toxoide del tétanos) y 218 μg de poli(ácido α -L-glutámico)-sodio (aproximadamente 200 μM) por 0,5 ml de dosis humana, en la que el PLG contiene, en promedio, 17 residuos de ácido glutámico (preferentemente con un M_w de 2.178 y opcionalmente con una polidispersidad de 2,6).

En todas las composiciones inmunógenas anteriores pueden añadirse excipientes a los ya mencionados. En particular, el PRP puede adsorberse en coadyuvante de fosfato de aluminio (como se describe en el documento WO 97/00697 y el documento WO 99/48525) pero esta preferentemente sin adsorber. La composición inmunógena puede tamponarse con cualquier tampón adecuado que tenga una pKa que pueda estabilizar el pH de la composición (típicamente a un pH 6-7, más preferentemente a un pH de 6,1). Por ejemplo puede usarse un tampón de histidina o, preferentemente, tampón de maleato. En general, deberían seleccionarse tampones (y cantidades usadas) que no afecten significativamente al efecto beneficioso del polímero polianiónico en la composición. En general, si está presente un tampón, debería usarse una concentración de tampón inferior a 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 o 0,1 mM, preferentemente aproximadamente 2 mM.

Si la composición inmunógena de la invención debe liofilizarse para fines de almacenamiento, es preferible que se añada un excipiente estabilizante (o crioprotector) a la composición. Puede usarse cualquier excipiente tal como glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, sorbitol, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinita, trehalosa, rafinosa, estaquiosa y melecitosa, pero preferentemente se usa sacarosa. Dichos excipientes están presentes típicamente en una cantidad del 1-5 % y preferentemente de aproximada o exactamente el 2,5 % (p/v).

Aunque las composiciones inmunógenas de la invención pueden tener un contenido antigénico que consiste en solo PRP (preferentemente conjugado a un vehículo proteico), puede comprender uno o más antígenos adicionales. El PRP puede mezclarse y almacenarse con estos antígenos adicionales o estos pueden añadirse extemporáneamente (por un practicante justo antes de administrar la composición a un paciente con necesidad de ello). El polímero polianiónico puede añadirse a los, uno o más, antígenos adicionales antes de combinar el PRP con los mismos o, preferentemente, está presente con el PRP como protector antes de combinar los antígenos adicionales con el mismo. Algunos de los antígenos adicionales pueden almacenarse con PRP (preferentemente liofilizado) y algunos se almacenan por separado (preferentemente líquidos) para reconstituirlos conjuntamente extemporáneamente, en los que el polímero polianiónico puede estar presente en cualquier composición, pero está presente preferentemente con el PRP.

Preferentemente, la composición inmunógena en adición al PRP (preferentemente conjugado) y al polímero polimérico comprende además uno o más conjugados de oligosacárido o, preferentemente, polisacárido capsular de meningococos-proteína vehículo (véase anteriormente para proteínas vehículo que comprenden epítopos T colaboradores, del modo más preferente toxoide del tétanos) seleccionados de un grupo que consiste en: MenC, MenY, MenA y MenW (e.g. A+C, A+Y, A+W, C+Y, C+W, Y+W, A+C+Y, A+C+W, A+Y+W, C+Y+W, A+C+Y+W);

preferentemente MenC y/o MenY están incluidos y más preferentemente todos los 4. Estos componentes de meningococos preferentemente no se adsorben intencionadamente en cualquier coadyuvante. Dichas composiciones inmunógenas están, de forma beneficiosa, liofilizadas, y pueden reconstituirse con antígenos adicionales (por ejemplo, composiciones basadas en DTPa o DTPw), preferentemente extemporáneamente. Por "extemporáneamente", en el presente documento, se quiere decir que la vacuna se administra en un periodo de 1,5 horas o 1 hora después de la preparación de la vacuna combinada, preferentemente en un periodo de 0,5 horas, del modo más preferente en un periodo de 15 minutos.

Alternativa o adicionalmente a los antígenos de meningococos anteriores, la composición inmunógena puede comprender uno o más conjugados de oligosacárido o polisacárido capsular de neumococos-proteína vehículo (véase anteriormente para proteínas vehículo preferentes que comprenden epítopes T colaboradores, del modo más preferente CRM197, toxoide de la difteria, toxoide del tétanos o proteína D).

Los oligosacáridos o polisacáridos (preferentemente los últimos) capsulares de neumococos representados en las composiciones de la invención comprenden típicamente antígenos derivados de al menos cuatro serotipos de neumococos. Preferentemente, los cuatro serotipos comprenden 6B, 14, 19F y 23F. Más preferentemente, al menos 7 serotipos están comprendidos en la composición, por ejemplo los derivados de serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Aún más preferentemente, al menos 11 serotipos están comprendidos en la composición (11-valente), por ejemplo los derivados de serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización preferente de la invención al menos 13 de dichos antígenos de neumococos conjugados están comprendidos, aunque también se contemplan por la invención antígenos adicionales, por ejemplo 23-valentes (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).

Para la vacunación de personas de edad avanzada (por ejemplo para la prevención de neumonía) se deben incluir de forma beneficiosa serotipos 8 y 12F (y del modo más preferente 15 y 22 también) a la composición antigénica de neumococos 11-valente descrita anteriormente para formar una composición 15-valente, mientras que para lactantes y niños pequeños (en los que se tiene más preocupación por la otitis media) están comprendidos, ventajosamente, los serotipos 6A y 19A para formar una composición 13-valente.

De nuevo, dichas composiciones inmunógenas que comprenden antígenos de neumococos están, de forma beneficiosa, liofilizadas, y pueden reconstituirse con antígenos adicionales (por ejemplo, composiciones basadas en DTPa), preferentemente extemporáneamente.

La composición inmunógena de la invención puede comprender adicionalmente, además de PRP y polímero polianiónico, uno o más (2 o preferentemente los 3 [una composición de DTPw o DTPa]) otros antígenos o grupos antigénicos seleccionados de toxoide del tétanos (TT), toxoide de la difteria (DT) y antígenos de *B. pertussis* de célula completa o uno o más no celulares. Los, uno o más (2, 3, 4 o los 5), antígenos de *B. pertussis* no celulares que pueden estar comprendidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: toxoide de la tos ferina (PT), FHA, pertactina (PRN), aglutinógeno 2 y aglutinógeno 3 (y preferentemente comprenden los tres primeros).

Dichas composiciones de DTPa o de DTPw pueden comprender cualquiera de una vacuna de polio inactivada (IPV) (típicamente sin adsorber antes del mezclado) y antígeno de superficie de hepatitis B (que está preferentemente adsorbido en fosfato de aluminio tal como se describe en el documento WO 93/24148).

DT, TT, PT, FHA y PRN se conocen bien en la técnica. El componente PT puede fabricarse en un toxoide bien químicamente o bien genéticamente, por ejemplo tal como se describe en el documento EP 515415. Véase también el documento EP 427462 y el documento WO 91/12020 para la preparación de antígenos de la tos ferina. Opcionalmente el componente PT puede ser recombinante (por ejemplo tal como se describe en las solicitudes de patente europea EP 306318, EP 322533, EP 396964, EP 322115 y EP 275689). Opcionalmente, los componentes DT y TT también pueden ser recombinantes. Típicamente, los componentes PT, FHA, PRN, HBsAg (antígeno de superficie de la hepatitis B), y los componentes PRP se encontrarán en el intervalo de 8-25 µg por 0,5 ml de dosis de vacuna a granel. Los componentes DT, TT y IPV (vacuna del virus de la polio trivalente inactivada) deberían estar presente típicamente en aproximadamente 15-25 Lf (unidades de floculación), 10 Lf y 40/8/32 (tipo I/II/III) DU respectivamente por 0,5 ml de dosis de vacuna a granel.

Componentes adecuados para su uso en dichas vacunas están disponibles comercialmente y se pueden obtener detalles en la Organización Mundial de la Salud. Por ejemplo, el componente IPV puede ser la vacuna de la polio inactivada de Salk. El antígeno de superficie de la hepatitis B puede comprender el antígeno 'S' como en Engerix-B™ (SmithKline Beecham Biologicals).

La adición de PRP bien liofilizado o bien líquido (bien no coadyuvado o bien adsorbido en fosfato de aluminio) a una solución de los componentes adicionales de la composición puede realizarse extemporáneamente (véase anteriormente) o antes de que el comerciante suministre la vacuna. El PRP puede combinarse con polímero polianiónico antes de su adición a los otros componentes, o el PRP puede añadirse a otros componentes que comprenden adicionalmente polímero polianiónico.

Las composiciones inmunógenas de la invención comprenderá típicamente, además, un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8, 9 o 10, típicamente una sal de aluminio, lo más a menudo alumbre o hidróxido de

aluminio. Este será particularmente el caso de composiciones que contienen DTPa, en las que uno o más componentes de DTPa están preferentemente adsorbidos en hidróxido de aluminio. Habitualmente dicho coadyuvante está presente en una composición inmunógena en la cantidad de 50-1250 o 100-1000 µg por 0,5 ml de dosis, habitualmente aproximada o exactamente 500 µg por 0,5 ml de dosis, de el que aproximadamente el 50, 60, 70, 80, 90 o el 95 % tiene antígeno (no PRP, habitualmente uno o más antígenos DTPa) específicamente adsorbidos en su superficie.

La presencia de dichos coadyuvantes normalmente tendería a floculación con cualquier PRP presente en la composición, pero en las composiciones inmunógenas de la presente invención esto se evita con la presencia del polímero polianiónico.

Alternativa, y preferentemente de forma adicional, la presencia del polímero polianiónico puede reducir la interferencia inmunológica que el coadyuvante tiene sobre PRP en más del 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o, preferentemente, el 100 % (midiéndose la interferencia tomando la diferencia en valoraciones de GMT anti-PRP en (µg/ml) en un modelo apropiado [por ejemplo, ratón o rata, o en un ensayo clínico humano bien realizado] entre administrar una vacuna PRP por sí misma frente a la misma vacuna PRP en una composición inmunógena que comprende el coadyuvante anterior, siendo la reducción de la interferencia la medida en la que el GMT en la composición inmunógena se restaura a la de la vacuna PRP por sí misma mediante la adición del polímero polianiónico de la invención a la composición inmunógena).

Cuando el coadyuvante anterior (con una carga de punto cero superior a 8, 9, 10 o 11) está incluido en las composiciones inmunógenas de la invención, esto es habitualmente debido a que determinados antígenos presentes en la composición son más eficaces cuando están adsorbidos en la superficie de dichos coadyuvantes (particularmente hidróxido de aluminio).

Una ventaja de las composiciones inmunógenas de la invención es que la presencia del polímero polianiónico (a diferencia de sales aniónicas regulares) no provoca una desorción significativa de antígenos que están adsorbidos específicamente en el coadyuvante anterior (es decir, con una carga de punto cero superior a 8). Por no provoca una "desorción significativa" se quiere decir típicamente que más del 50, 60, 70, 80 o, preferentemente, el 90 % de antígeno que se ha adsorbido específicamente (es decir, adsorbido intencionadamente y/o adsorbido en una etapa de adsorción aparte antes del mezclado con otros componentes de vacuna) en el coadyuvante permanece adsorbido en el coadyuvante después de 15 minutos o 1 hora después de añadir el polímero polianiónico a la composición inmunógena de la invención. En general, es preferente que haciendo esto permanezca suficiente antígeno adsorbido en el coadyuvante para que la valoración de GMT anti-antígeno en (µg/ml) en un modelo apropiado [por ejemplo, ratón o rata, o en un ensayo clínico humano bien conducido] sea superior al 50, 60, 70, 80, 90 o al 95 % de la valoración de GMT del antígeno en la misma composición inmunógena sin polímero polianiónico en el mismo modelo.

Típicamente, pueden estar presentes uno o más de los antígenos siguientes en la composición inmunógena de la invención y se pueden haber adsorbido específicamente (y preferentemente de forma individual) en un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8 (preferentemente hidróxido de aluminio) antes del mezclado con los otros componentes de la composición inmunógena de la invención: toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, toxoide de la tos ferina, FHA y pertactina (PRN). Preferentemente, al menos la PRN está adsorbida en hidróxido de aluminio y del modo más preferente todos los 5 componentes están adsorbidos en hidróxido de aluminio.

Los procedimientos de adsorción de antígenos DTPa y DTPw en coadyuvantes de aluminio son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/24148 y WO 97/00697. Los componentes habituales adsorbidos en coadyuvante se dejan durante un periodo de al menos 10 minutos antes del mezclado de los antígenos entre sí en la combinación de composiciones inmunógenas de la presente invención.

Otros componentes están preferentemente no adsorbidos (tales como IPV) o adsorbidos específicamente en otros coadyuvantes (adsorbiéndose preferentemente el antígeno de superficie de la hepatitis B (HepBsa) en fosfato de aluminio (tal como se describe en el documento WO 93/24148) antes del mezclado con otros componentes).

Las vacunas de combinación típicas de la invención comprenden: DTPa IPV HepBsa PRP (preferentemente conjugado con TT) PLG; DTPa IPV HepBsa PLG PRP MenC y/o MenY (en el que los sacáridos capsulares están conjugados preferentemente con TT). Como se ha mencionado anteriormente, el PLG puede reducir eventos de agregación que reducen la inmunogenicidad de epítopes de sacáridos capsulares de meningococos de determinadas vacunas. Dichas combinaciones de la invención pueden comprender: DTPw HepBsa PLG Hib MenA y/o MenC (en el que los sacáridos capsulares están conjugados preferentemente con TT).

En una realización preferente, se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunógena de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. El pH de las vacunas de la presente invención se encuentra habitualmente entre pH 6-7, preferentemente en un pH de 6,1.

La preparación de vacuna se describe generalmente en Vaccine Design (The subunit and adjuvant approach Ed. Powell and Newman; Pellum Press.) Ventajosamente, la vacuna de combinación según la invención es una vacuna pediátrica.

- La cantidad de antígeno conjugado de polisacárido u oligosacárido en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Dicha cantidad variará en función de qué inmunógenos específicos se usen. Generalmente se espera que cada dosis comprenda 1-1000 µg de polisacáridos u oligosacáridos conjugados (expresados en cantidad de sacárido), preferentemente 2-100 µg, más preferentemente 4-40, 2-15 o 3-10 µg, del modo más preferente aproximada o exactamente 5 µg.
- El contenido de antígenos proteicos en la vacuna se encontrará típicamente en el intervalo de 1-100 µg, preferentemente 5-50 µg, del modo más típico en el intervalo de 5-25 µg.
- Una cantidad óptima de antígeno para una vacuna particular puede determinarse mediante estudios estándar que implican la observación de valoraciones de anticuerpos y de otras respuestas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o dos inyecciones de refuerzo a intervalos de aproximadamente 4 semanas o más largos.
- Las preparaciones de vacunas de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero (preferentemente un ser humano) susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna mediante una vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir la inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o (menos preferente) por medio de administración mucosal a los aparatos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario.
- Además se proporciona un procedimiento de prevención o de tratamiento de una enfermedad por *H. influenzae* B (o enfermedad asociada con un antígeno de bajo pl de la invención) administrando una cantidad farmacéuticamente eficaz de la vacuna de la invención a un paciente con necesidad de ello y el uso de la composición inmunógena o vacuna de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad por *H. influenzae* B disease.
- La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para reducir la interferencia inmunológica y/o la floculación de un polisacárido u oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP), que está preferentemente conjugado, en una combinación de vacuna (una vacuna de la invención que comprende PRP y al menos un antígeno adicional) que comprende uno o más antígenos adicionales adsorbidos a un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8 (tal como se ha descrito anteriormente, preferentemente hidróxido de aluminio), en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:
- (i) adsorber los, uno o más, antígenos adicionales en el coadyuvante;
 - (ii) añadir un polímero polianiónico a dichos, uno o más, antígenos adicionales, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio 8-117 residuos y que comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico; y
 - (iii) después añadir una composición inmunógena que comprende PRP a dichos, uno o más, antígenos adicionales;
- o comprende las etapas de:
- (i) adsorber los, uno o más, antígenos adicionales en el coadyuvante; y
 - (ii) añadir una composición inmunógena de la invención que comprende PRP y un polímero polianiónico a dichos, uno o más, antígenos adicionales, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y que comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico.
- En el primero, el coadyuvante se controla antes de añadir PRP, en el último el PRP se protege antes de añadirlo al coadyuvante. Preferentemente, en cada procedimiento los componentes se mezclan extemporáneamente. La composición inmunógena que comprende PRP se liofiliza preferentemente para lograr la máxima estabilidad, del modo más preferente en presencia de un excipiente estabilizante (tal como se ha descrito anteriormente). La composición inmunógena que comprende PRP se combina preferentemente con uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de meningococos conjugados y/o uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de neumococos conjugados (tal como se descrito anteriormente).
- Preferentemente los, uno o más, antígenos adicionales adsorbidos en el coadyuvante se seleccionan de toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, toxoide de la tos ferina, FHA y pertactina, del modo más preferente todos, tal como se ha descrito anteriormente. Del modo más preferente, tal como se ha descrito anteriormente, la presencia del

polímero polianiónico en la vacuna de combinación no provoca una desorción significativa de los, uno o más, antígenos adicionales adsorbidos en el coadyuvante.

5 También se proporciona un uso de un polímero polianiónico, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio 8-117 residuos y que comprende unidades de repetición
 10 constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico; en una composición inmunógena que además comprende un polisacárido u oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP), preferentemente conjugado, como un medio de protección de la respuesta inmunitaria del PRP. Por proteger la respuesta inmunitaria se quiere decir retener más del 50, 60, 70, 80, 90 o del 95 % de la valoración de GTM anti-PRP del componente PRP por sí mismo, independientemente de si la composición inmunógena se combina posteriormente con una vacuna que comprende coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8 (tal como se ha descrito anteriormente).

15 Además, se proporciona un kit que comprende: i) una primera composición inmunógena que comprende un polisacárido u oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP), preferentemente conjugado, y un polímero polianiónico, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas del grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico y ii) una segunda composición inmunógena que comprende uno o más antígenos adsorbidos en un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8 (preferentemente hidróxido de aluminio). Preferentemente, la primera composición inmunógena está liofilizada y además comprende un excipiente estabilizante (tal como se ha descrito anteriormente), preferentemente sacarosa, y la segunda composición inmunógena es líquida. Se prevé que el contenido del kit pueda administrarse sencillamente reconstituyendo extemporáneamente la primera composición
 20 inmunógena con la segunda composición inmunógena y administrando la composición mixta resultante. Es muy preferente que los polímeros aniónicos de uso en la presente invención puedan disolverse en solución acuosa más rápidamente que conjugados de PRP o PRP, de modo que cuando está coliofilizado, el polímero (tal como PLG) pueda proteger eficazmente el PRP que se disuelve más lentamente cuando se reconstituye en una composición líquida que comprende coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8.

30 Preferentemente, la primera composición inmunógena comprende adicionalmente uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de meningococos seleccionados de un grupo que consiste en: MenC, MenY, MenA y MenW (por ejemplo, A+C, A+Y, A+W, C+Y, C+W, Y+W, A+C+Y, A+C+W, A+Y+W, C+Y+W, A+C+Y+W), preferentemente MenC y/o MenY, y/o uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de neumococos conjugados). Preferentemente, la segunda composición inmunógena comprende uno o más (del modo más preferente todos) antígenos seleccionados de un grupo que consiste en: toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, toxoide de la tos ferina, FHA y pertactina. Puede comprender alternativamente DTPw.

Los ejemplos siguientes ilustran, pero no limitan el ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

40 Se realizaron numerosos experimentos con polisacárido PRP conjugado con el toxoide del tétanos (PRP-T) junto con lotes experimentales de PLG (Hib-PLG). Se evaluaron los parámetros siguientes:

- el peso molecular y el contenido de PLG,
- el contenido de PRP-T,
- el estabilizante para la liofilización.

45 Los resultados siguientes son los análisis *in-vitro*, preclínico y de potencia de estos lotes experimentales.

Resultados con los lotes experimentales

Datos *in vitro* con Hib-PLG

50 Se realizaron tres tipos de etapas de mezclado para demostrar la eficacia del PLG en la reducción de la interacción física entre PRP-T y Al(OH)₃, incluido el mezclado de la vacuna Infanrix Penta™ comercialmente disponible con la vacuna Hib-PLG:

- Etapa 1: presaturación, con la que en primer lugar se adsorbió PLG en Al(OH)₃, después se añadió PRP-T.
- Etapa 2: competencia, con lo que PLG entró en competencia con PRP-T para su adsorción en Al(OH)₃
- Infanrix-Penta™/Hib-PLG: con lo que el PLG y el PRP-T se coliofilizaron y después entraron en competencia para su adsorción en vacuna Infanrix-PeNTa™, que contenía 500 µg de Al(OH)₃

En las 3 etapas, el PLG fue capaz de evitar la floculación inducida por el PRP-T (véanse las figuras 1 y 2).

El contenido de PLG 200 μ M (Mw 2.200) se seleccionó para la formulación clínica ya que:

- no se observó floculación,
- aproximadamente el 80 % del PRP-T estaba sin adsorber (según el ensayo Dionex)
- 5 • el PLG se adsorbió totalmente
- todos los componentes principales de Infanrix (antígeno de superficie DT, TT, PT, FHA, PRN [o 69K], IPV y HB) no se vieron afectados.
- se encontró que tanto la lactosa como la sacarosa eran crioprotectores eficaces.

10 En la figura 1 se muestra la presaturación de $Al(OH)_3$ con PLG (106 residuos). 10 μ g de PRP/dosis, 500 μ g de AIOH. Se halló también que el PLG 2000 μ M (Mw 1043-8 residuos) podía mantener el 80 % del PRP-T en el sobrenadante (10 μ g de PRP/dosis, 500 μ g de AIOH) sin que se produzca ninguna floculación.

La figura 2 muestra la competencia entre PRP-T y PLG (85 residuos). El PLG 100 μ M, Mw 10.900, era capaz de limitar la adsorción de Hib 10 g en 50 (para imitar $Al(OH)_3$ hipotéticamente libre en Infanrix PeNTa), así como en 500 μ g de $Al(OH)_3$ (= dosis de $Al(OH)_3$ completa en Infanrix PeNTa).

15 Además, el PLG 500 μ M, Mw 2.178, (17 residuos) era capaz de limitar la adsorción de Hib 10 μ g en $Al(OH)_3$ después de reconstitución de la torta de [Hib-PLG] con Infanrix PeNTa (1 h de contacto, después centrifugación durante 6 min a 6500 g y dosificación de Hib en sobrenadante por ELISA PRR'P-TT o dosificación Dionex), tal como puede para PLG 75 μ M, Mw 10.900 (85 residuos).

20 El PLG, Mw 2.178 (17 residuos), es capaz de limitar la adsorción de Hib 5 μ g (PRP-T) en $Al(OH)_3$ después de reconstitución de la torta de [Hib-PLG] con Infanrix PeNTa (1 h de contacto, después centrifugación durante 6 min a 6500 g y dosificación de Hib en sobrenadante por ELISA PRR'P-TT o Dionex dosage): 175 y 200 μ M fueron concentraciones óptimas en la que hay ausencia de floculación y la adsorción del antígeno Infanrix se mantiene.

25 El PLG, Mw 10.800 (85 residuos), es capaz de limitar la adsorción de Hib 5 μ g (PRP-T) en $Al(OH)_3$ después de reconstitución de la torta de [Hib-PLG] con Infanrix PeNTa (1 h de contacto, después centrifugación durante 6 min a 6500 g y dosificación de Hib en sobrenadante por ELISA PRR'P-TT o dosificación Dionex): 30 y 35 μ M fueron concentraciones óptimas en la que hay ausencia de floculación y la adsorción del antígeno Infanrix se mantiene.

Datos de inmunogenicidad preclínica con Hib-PLG

30 Se evaluaron formulaciones experimentales de Hib-PLG en un modelo de conejo de inmunogenicidad y un modelo de rata bebé, permitiendo la evaluación de interferencia inmunitaria del Hib (conjugado con PRP-T) inducida mediante la combinación de vacunas Infanrix Penta y Hib. Además, se evaluó el impacto de Hib-PLG sobre la eficacia de Infanrix-Penta en un modelo murino de colonización de pulmón con *B. pertussis*.

Modelo de conejo de inmunogenicidad

Diseño del estudio

35 En este modelo, se inmunizaron por vía intramuscular conejos hembra de Nueva Zelanda de 5 semanas de edad tres veces en intervalos de dos semanas (días 0, 14, 28) con una dosis humana de vacuna. Se usó un tamaño de muestra de 10 animales por grupo. Se tomaron muestras de sangre el día 21, 28, 35 y 42. Se midieron anticuerpos anti-PRP mediante ELISA y se expresaron en μ g/ml.

Vacunas administradas

40 Se evaluaron formulaciones de PRP-T (5 μ g de PRP) que contenían PLG de peso molecular alto (HMW) (10.900 de MW) y bajo (LMW) (2.200 de MW) en dos concentraciones. Se incluyó como control una formulación similar de Hib pero sin PLG. Véase más adelante para más detalles de las vacunas administradas por grupo.

Grupo	Vacuna
1	Hib (5 μ g) PLG HMW (10900) 30 μ M
2	Hib (5 μ g) PLG HMW (10900) 70 μ M
3	Hib (5 μ g) PLG LMW (2200) 175 μ M
4	Hib (5 μ g) PLG LMW (2200) 450 μ M
5	Hib (5 μ g)
6	PLG HMW (10900) 40 μ

Resultados

Véase la Figura 3.

Aunque puede observarse alguna variabilidad de la respuesta de PRP en este modelo de conejo, no se demostró una diferencia significativa entre grupos.

5 Hubo una ligera reducción de la inmunogenicidad observada en conejos que habían recibido Hib-PLG de LMw 175 μ M, pero todas las otras formulaciones indujeron niveles de anticuerpos anti-PRP similar al grupo de control de Hib sin adición de PLG.

No se demostró ninguna inducción de anticuerpos anti-PLG después de la inmunización de conejos con estas formulaciones experimentales de Hib-PLG.

Modelo de rata bebé de interferencia de Hib

10 **Diseño del estudio**

Se inmunizaron por vía intramuscular ratas OFA de siete días de edad tres veces en intervalos de dos semanas (días 0, 14, 28) con 1/10 de una vacuna de dosis de 0,5 ml humana. Se realizó un reparto igual de ratas macho y hembra. Se usó un tamaño de muestra de 20 animales por grupo. Se tomaron muestras de sangre el día 35 y se midieron anticuerpos anti-PRP mediante ELISA y se expresaron en μ g/ml.

15 **Vacunas administradas**

Como control de interferencia en el modelo de rata bebé, se administró Hib combinado con Infanrix-Penta (10 μ g de PRP), así como también se coadministró Hib (10 μ g) con Infanrix Penta. Se evaluó Hib (5 μ g) formulado solo o que contenía diversas cantidades de PLG después de reconstitución con Infanrix Penta. Véase más adelante para más detalles de las vacunas administradas por grupo.

Grupo	Vacuna
1	Hib (10 μ g) + Infanrix Penta
2	Hib (10 μ g) reconstituida con Infanrix Penta
3	Hib (5 μ g) PLG HMW (10900) 30 μ M reconstituida con Infanrix Penta
4	Hib (5 μ g) PLG HMW (10900) 75 μ M reconstituida con Infanrix Penta
5	Hib (5 μ g) PLG LMW (2200) 175 μ M reconstituida con Infanrix Penta
6	Hib (5 μ g) PLG LMW (2200) 500 μ M reconstituida con Infanrix Penta
7	Hib (5 μ g) reconstituida con Infanrix Penta

20 **Resultados**

Véase la Figura 4.

Cuando se administra Hib con Infanrix-Penta se observó interferencia inmunitaria en comparación con Hib coadministrado por separado con Infanrix-Penta.

25 La presencia de PLG en formulaciones con Hib dio como resultado la restauración parcial o total de la respuesta anti-Hib. De hecho, se observó una respuesta inmunitaria superior frente a PRP en todas las formulaciones de Hib que contenían PLG en comparación con el grupo de control (grupo 7).

Estos resultados demuestran que la prevención de la interacción de Hib con adsorción en $Al(OH)_3$ mediante la adición de PLG puede restaurar valoraciones de anticuerpos anti-PRP altas elicidadas mediante vacuna de Hib monovalente.

30 No se demostró ninguna inducción de anticuerpos anti-PLG después de la inmunización de ratas bebé con estas formulaciones experimentales de Hib-PLG.

Mantenimiento de la adsorción de antígenos en hidróxido de aluminio

35 Se combinaron 5 μ g (sacárido) de PRP-T (Hib) con diferentes cantidades de PLG (Sigma) de Mw 2.600 para obtener una concentración final de 0,175 o 200 μ M en la vacuna reconstituida. Las muestras se liofilizaron en presencia de sacarosa. Las muestras se reconstituyeron después con Infanrix PeNTa y después de 1 hora se midió la recuperación de antígeno sin adsorber en el sobrenadante (s/n). Los resultados son los siguientes:

	Control (0 PLG)	PLG 175 µM	PLG 200 µM
¿Floculación?	Sí	No	No
% Hib en s/n	0	0	0
% DT en s/n	0	1	4
% TT en s/n	0	8	17
% PT en s/n	3	3	3
% FHA en s/n	0	0	0
% 69K (PRN) en s/n	0	11	15
% HepBsa en s/n	1	1	1
% IPV tipo I en s/n	5	5	17
% IPV tipo II en s/n	5	5	5
% IPV tipo III en s/n	5	38	54

Conclusión: Los antígenos que deberían estar adsorbidos, de forma benéfica, en el coadyuvante de Al(OH)₃ (TT y pertactina) se mantuvieron en gran medida en estado adsorbido. El IPV de tipo III parece el más sensible de desorción, sin embargo se adsorbió en alguna medida. También debe indicarse que los antígenos IPV no se adsorben específicamente en el coadyuvante antes de la combinación con los otros antígenos; más bien el IPV está mezclado con los otros antígenos en un estado no adsorbido. Es interesante señalar que en este experimento el Hib parece estar totalmente adsorbido en el coadyuvante, pero el PLG evita aún que ocurran eventos de floculación (e interferencia inmunitaria de Hib). Típicamente el coadyuvante no está saturado con PLG a 200 µM (290 µg/ml) y se vuelve saturado (comienza a haber presencia de LG libre en solución) solo a concentraciones de aproximadamente 650 µg/ml en cuyo punto el PRP está en aproximadamente el 60 % libre en solución. Las vacunas PLG aprueban criterios de aprobación de potencia QC que incluyen ensayos de provocación de tos ferina.

Ejemplo 2: Análisis de combinaciones [DTPw / MenACHib] por microscopía óptica

La reconstitución de DTPaHepB IPV con conjugado de Hib induce la floculación del aluminio contenido en DTPaHepB IPV (véase la figura 5). Estas pueden observarse visualmente y mediante microscopía óptica y pueden medirse mediante análisis del tamaño y la sedimentación. La figura 7 muestra una representación de microscopía óptica de Infanrix-peNTa (DTPaHepBIPV). La figura 8 presenta la muestra floculando cuando se añaden 5 µg de sacárido de PRP-TT a la muestra. La figura 9 muestra que se produce floculación en presencia de 200 µM PLG de Mw 2.200 (Sigma).

Este ejemplo buscaba descubrir si los conjugados de polisacárido MenACHib-TT inducen la aparición de floculación de aluminio cuando se mezclan con vacunas DTPwHB y si el PLG podría aliviar esto.

Procedimientos y materiales

El DTPaHepB IPV (Infanrix) analizado tenía Al(OH)₃ 500 µg, AlPO₄ 200 µg por dosis humana. El DTPwHepB (Infanrix) analizado tenía Al(OH)₃ 260 µg, AlPO₄ 370 µg por dosis humana. El PRP-TT (Hib) estaba sin coadyuvar, así como los conjugados de polisacárido capsular MenA-TT y MenC-TT. Se usaron 5 µg de sacárido de los conjugados por dosis en todos los experimentos.

El análisis fue por microscopía óptica acoplada a un analizador de imagen (sistema KS400). Las muestras de DTPw se mezclaron con muestras de MenACHib que comprendían PLG durante 15 minutos antes de la observación.

Resultados

No se observó floculación en los controles DTPw (figura 10) pero se observó en muestras DTPw con MenACHib-TT reconstituido (figura 11). El MenACHib-TT solo no floculó.

Las interacciones electrostáticas entre conjugados de MenA, MenC polianiónicos y polisacárido Hib y Al(OH)₃ catiónico son probablemente la razón de este fenómeno (Figura 5).

La floculación puede reducirse mediante la adición de un excipiente polianiónico competitivo, por ejemplo PLG. La figura 12 muestra que DTPwHepB/MenACHib con PLG 250 µM muestra una floculación reducida.

Conclusiones

Los conjugados de MenACHib-TT puede inducir floculación de aluminio en combinaciones [DTPw / MenACHib]. Esto puede reducirse mediante la adición de un excipiente polianiónico competitivo.

5 **Ejemplo 3: Un ensayo clínico parcialmente ciego, aleatorizado, de fase II para evaluar la inmunogenicidad y la reactogenicidad de vacunas de DTPa-HBV-IPV/Hib combinadas de GSK Biologicals (nueva formulación con PLG) en comparación con la vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib con licencia de comercialización de GSK Biologicals (INFANRIX HEXA™) y a la administración concomitante de vacunas DTPa-HBV-IPV (INFANRIX PENTA™) y Hib (HIBERIX™) de GSK Biologicals cuando se administran como vacunación primaria a niños sanos de 2, 3 y 4 meses de edad.**

10 Este estudio se realizó en 9 centros de Polonia.

Objetivos:

Principal:

15 • Evaluar la inmunogenicidad de DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación con PLG) en términos de respuesta de anticuerpos anti-PRP en comparación con Hib (HIBERIX™) coadministrado con DTPa-HBV-IPV (INFANRIX PENTA™) y en comparación con DTPa-HBV-IPV/Hib (INFANRIX HEXA™, formulación con licencia de comercialización) un mes después de un curso de vacunación primaria de tres dosis.

Secundarios:

20 • Evaluar la inmunogenicidad de DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación con PLG) en términos de respuesta de todos los antígenos adicionales de vacuna en comparación con Hib coadministrado con DTPa-HBV-IPV y en comparación con DTPa-HBV-IPV/Hib (formulación con licencia de comercialización) un mes después de un curso de vacunación primaria de tres dosis.

• Evaluar la respuesta inmunitaria de poli-L-glutamato (PLG) en términos de detección de anticuerpos y la concentración un mes después de un curso de vacunación primaria de tres dosis.

25 • Evaluar la seguridad y la reactogenicidad de las vacunas en estudio en términos de síntomas solicitados, síntomas no solicitados y eventos adversos graves (SAE).

Diseño del estudio

Estudio aleatorizado parcialmente ciego con tres grupos paralelos:

- DTPa-HB V-IPV/Hib (nueva formulación con PLG)
- DTPa-HBV-IPV/Hib (formulación con licencia de comercialización)
- 30 - DTPa-HBV-IPV + Hib (formulación con licencia de comercialización)

El estudio se realizó de un modo simple ciego con respecto a los grupos que recibieron DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación con PLG) y DTPa-HBV-IPV/Hib (formulación con licencia de comercialización). El grupo que recibió dos inyecciones separadas (DTPa-HBV-IPV + Hib) estaba abierto.

35 Se administraron tres dosis de cada vacuna por vía intramuscular según una agenda de 0, 1 meses a niños pequeños sanos que tenían 2 meses de edad en el momento de la primera dosis (figura 6). Se tomaron dos muestras de sangre (a 2 y 5 meses de edad) de cada sujeto.

Número de sujetos:

Completado: 149 (49 en grupo de DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación), 50 en el grupo de DTPa-HBV-IPV/Hib (formulación con licencia de comercialización), 50 en el grupo de DTPa-HBV-IPV + Hib)

40 *Seguridad.* Cohorte vacunada total: 150 (49 en grupo de DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación), 50 en el grupo de DTPa-HBV-IPV/Hib (formulación con licencia de comercialización), 51 en el grupo de DTPa-HBV-IPV + Hib)

Inmunogenicidad: Cohorte ATP: 147 (48 en grupo de DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación), 49 en el grupo de DTPa-HBV-IPV/Hib (formulación con licencia de comercialización), 50 en el grupo de DTPa-HBV-IPV + Hib)

Diagnóstico y criterios de inclusión:

45 Niños nacidos después de un periodo de gestación normal de 36-42 semanas, de 8-12 semanas de edad en el momento de la primera dosis de vacuna, carentes de problemas de salud obvios tal como se establece en su

historial médico y un examen clínico antes de entrar en el estudio y con un consentimiento informado por escrito obtenido de sus padres o tutores del sujeto.

Dosis y modo de administración de la vacuna del estudio:

Programación/sitio de vacunación

- 5 Cada una de las vacunas del estudio se administró a los 2, 3 y 4 meses de edad. Las vacunas se administraron como una única inyección por vía intramuscular en el muslo izquierdo para la vacuna de *Haemophilus influenzae* tipo b y en el muslo derecho para todas las otras vacunas.

10 Para preparar la vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación y formulación con licencia de comercialización), la vacuna de DTPa-HBV-IPV líquida se reconstituye con la vacuna de Hib respectiva. La vacuna de *Haemophilus influenzae* tipo b se reconstituyó con el diluyente salino suministrado.

Composición/dosis de las vacunas

- Una dosis de vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib de GSK Biologicals (nueva formulación) consistía en:

Componente DTPa-HBV-IPV:

15 Toxide de difteria ≥ 30 UI (25 Lf), toxide del tétanos ≥ 40 UI (10 Lf), toxide de tos ferina (PT) 25 μ g, hemaglutinina filamentosa (FHA) 25 μ g, pertactina (PRN) 8 μ g, antígeno de superficie de la hepatitis B (recombinante) 10 μ g, poliovirus de tipo 1: 40 unidades de antígeno D, tipo 2: 8 unidades de antígeno D, tipo 3: 32 unidades de antígeno D, sales de aluminio 0,7 mg, 2-fenoxietanol $\leq 2,5$ mg, cloruro de sodio 150 mM, formalina ≤ 100 μ g, sulfato de neomicina ≤ 25 μ g y polisorbato ≤ 50 μ g.

Componente Hib:

20 Fosfato de polirribosilribitol (PRP) 5 μ g, toxide de la tos ferina 10-20 μ g, sacarosa 2,52 % y poli-L-glutamato 200 μ M [290 μ g/ml] (Mw 2.200, 17 residuos).

- Una dosis de vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib de GSK Biologicals (formulación con licencia de comercialización) consistía en:

Componente DTPa-HBV-IPV:

25 Toxide de difteria ≥ 30 UI (25 Lf), toxide del tétanos ≥ 40 UI (10 Lf), toxide de tos ferina (PT) 25 μ g, hemaglutinina filamentosa (FHA) 25 μ g, pertactina (PRN) 8 μ g, antígeno de superficie de la hepatitis B (recombinante) 10 μ g, poliovirus de tipo 1: 40 unidades de antígeno D, tipo 2: 8 unidades de antígeno D, tipo 3: 32 unidades de antígeno D, sales de aluminio 0,7 mg, 2-fenoxietanol $\leq 2,5$ mg, cloruro de sodio 150 mM, formalina ≤ 100 μ g, sulfato de neomicina ≤ 25 μ g y polisorbato ≤ 50 μ g.

30 *Componente Hib:*

Fosfato de polirribosilribitol (PRP) 10 μ g, toxide del tétanos 20-40 μ g, aluminio 0,12 mg y lactosa 12,6 mg.

- Una dosis de vacuna de DTPa-HBV-IPV de GSK Biologicals consistía en:

35 Toxide de difteria ≥ 30 UI (25 Lf), toxide del tétanos ≥ 40 UI (10 Lf), toxide de tos ferina (PT) 25 μ g, hemaglutinina filamentosa (FHA) 25 μ g, pertactina (PRN) 8 μ g, antígeno de superficie de la hepatitis B (recombinante) 10 μ g, poliovirus de tipo 1: 40 unidades de antígeno D, tipo 2: 8 unidades de antígeno D, tipo 3: 32 unidades de antígeno D, sales de aluminio 0,7 mg, 2-fenoxietanol $\leq 2,5$ mg, cloruro de sodio 150 mM, formalina ≤ 100 μ g, sulfato de neomicina ≤ 25 μ g y polisorbato ≤ 50 μ g.

- Una dosis de vacuna de *Haemophilus influenzae* tipo b de GSK Biologicals consistía en:

40 Fosfato de polirribosilribitol (PRP) 10 μ g, toxide del tétanos 20-40 μ g y lactosa 10,08 mg.

Criterios para la evaluación:

Inmunogenicidad:

Punto final principal

Concentraciones de anticuerpos anti-PRP un mes después del curso de vacunación principal de tres dosis.

45 **Punto final secundario**

Inmunogenicidad:

Un mes después del curso de vacunación primario de tres dosis.

• Los estados de seroprotección para los antígenos de vacuna fueron los siguientes:

- Concentraciones de anticuerpo anti-PRP $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$
- 5 - Concentraciones de anticuerpos anti-HB $\geq 10 \text{ mIU/ml}$
- Concentraciones de anticuerpo anti-toxoide de la difteria $\geq 0,1 \text{ IU/ml}$
- Concentraciones de anticuerpo anti-toxoide del tétanos $\geq 0,1 \text{ IU/ml}$
- Valoraciones de anticuerpos anti-poliovirus tipo 1 ≥ 8
- Valoraciones de anticuerpos anti-poliovirus tipo 2 ≥ 8
- 10 - Valoraciones de anticuerpos anti-poliovirus tipo 3 ≥ 8
- Tasas de seropositividad anti-PT, anti-FHA y anti-PRN (concentraciones de anticuerpos $\geq 5 \text{ EL.U/ml}$).
- Concentraciones de anticuerpos anti-PT, anti-FHA, anti-PRN, anti-toxoide de la difteria, anti-toxoide del tétanos, anti-poliovirus tipos 1, 2 y 3 y anti-HB.
- Tasas de respuesta a la vacuna a PT, FHA y PRN, definidas como aparición de anticuerpos en sujetos que eran seronegativos en el punto temporal de la vacunación (es decir, con concentraciones de anticuerpo $< 5 \text{ EL.U/ml}$) o al menos mantenimiento de las concentraciones de anticuerpos antes de la vacunación en sujetos que eran seropositivos en el punto temporal de la vacunación (es decir, con concentraciones de anticuerpo $< 5 \text{ EL.U/ml}$), tomando en consideración la reducción de anticuerpos maternos.
- Detección y concentración de anticuerpos anti-PLG.
- 20 *Seguridad.* Registro de síntomas solicitados (dolor, enrojecimiento, hinchazón, somnolencia, fiebre, irritabilidad/remilgos, pérdida de apetito) durante el periodo de 4 días (día 0 - día 3) después de cada vacunación de estudio. Registro de síntomas no solicitados que tienen lugar del día 0 al día 30 después de cada vacunación de estudio y eventos adversos graves (SAE) durante la totalidad del periodo de estudio.
- Aparición de síntomas locales solicitados durante el periodo de 4 días (día 0 – día 3) después de la vacunación .
- 25 • Aparición de síntomas generales solicitados durante el periodo de 4 días (día 0 – día 3) después de la vacunación .
- Aparición de síntomas no solicitados durante el periodo de 31 días (día 0 – día 30) después de la vacunación .
- Aparición de eventos adversos graves (SAE) durante la totalidad del estudio.

Procedimientos estadísticos:

30 *Análisis de inmunogenicidad:* El análisis de inmunogenicidad se realizó sobre la cohorte de ATP. Los análisis siguientes que se han realizado para cada grupo de tratamiento proporcionaron un resultado serológico en cada punto temporal: La media geométrica de las concentraciones/valoraciones de anticuerpos (GMC/GMT) con el 95 % de intervalo de confianza (CI) se tabularon para anti-PRP y para anticuerpos frente a cada antígeno de vacuna. Las tasas de seropositividad/seroprotección con unos IC exactos del 95 % se tabularon. Las tasas de respuesta de vacuna (después de la dosis 3) a los antígenos de tos ferina y su IC exacto del 95 % se tabularon y la distribución de concentraciones/valoraciones de anticuerpos para cada antígeno después de la dosis 3 se representaron usando curvas de distribución acumulativa inversa.

35 La inmunogenicidad de la vacuna DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación con PLG) se comparó con la de las vacunas con licencia de comercialización computando tanto el IC del 95 % para el grupo de la relación GMC/GMT para cada antígeno un mes después de la tercera dosis de vacuna como el IC del 95 % asintótico normalizado para la diferencia en tasas de seroprotección/seropositividad para cada antígeno un mes después de la tercera dosis de vacuna.

40 *Análisis de seguridad:* El análisis de seguridad se realizó sobre la totalidad de la cohorte de vacunación. Dentro de los grupos, la incidencia de cada síntoma solicitado que tuvo lugar dentro de un periodo de 4 días después de la vacunación se determinó por grupo tabulando el porcentaje de dosis con el síntoma y su IC exacto del 95 % tanto a cada dosis como después de las tres dosis para todos los grupos y tabulando el porcentaje de sujetos con el síntoma y su IC exacto del 95 % para todos los grupos. El porcentaje de sujetos con síntomas no solicitados con su IC exacto del 95 % se tabuló por grupo y por término preferido por la OMS y se realizó una tabulación similar para síntomas no solicitados de grado "3" y para síntomas no solicitados posiblemente relacionados con la vacunación.

5 Además, se informó del número de sujetos que experimentaron al menos un evento adversos grave (SAE) durante la totalidad del periodo de estudio. Un valor de p de dos lados del ensayo exacto de Fisher y los IC del 95 % asintóticos normalizados para las diferencias entre DTPa-HBV-IPV/Hib (nueva formulación) y cada uno de los grupos de control se computaron para el porcentaje de sujetos con un síntoma dado de cualquier intensidad dentro de un periodo de 4 días después de la vacunación, así como el porcentaje de sujetos con fiebre rectal > 39,0 °C dentro de un periodo de 4 días después de la vacunación y el porcentaje de sujetos que recibieron antipiréticos dentro de un periodo de 4 días después de la vacunación.

Resultados de inmunogenicidad:

10 • La respuesta inmunitaria a PRP después de la vacunación con DTPa-HB V-IPV/Hib PLG fue similar a la de Hiberix y estadísticamente superior a la respuesta a Infanrix hexa ($p < 0,05$), tanto en términos de GMC como de tasas de seroprotección (tabla 1).

• La respuesta inmunitaria a todos los componentes antigénicos de la vacuna fue similar en términos de tasas de seroprotección para difteria, tétanos, hepatitis y poliovirus y en términos de tasas de respuesta de vacuna a antígenos de la tos ferina (tabla 2).

15

Tabla 1: Respuesta al antígeno PRP en los grupos de estudio ((cohorte de ATP para inmunogenicidad)

Grupo	Agenda	N	≥ 0,15 mg/ml				≥ 1mg/ml				GMC (mg/ml)			
			n	%	95% CI		N	%	95% CI		Valor	95% CI		
					LL	UL			LL	UL		LL	UL	
DTPa-HBV-IPV/HibPLG	PRE	48	17	35,4	22,2	50,5	1	2,1	0,1	11,1	0,137	0,106	0,179	
	PIII	47	47	100,0	92,5	100,0	36	76,6	62,0	87,7	3,375	2,314	4,924	
DTPa-HBV-IPV/Hib	PRE	49	18	36,7	23,4	51,7	6	12,2	4,6	24,8	0,177	0,122	0,255	
	PIII	49	42	85,7	72,8	94,1	29	59,2	44,2	73,0	1,164	0,711	1,904	
DTPa-HBV-IPV + Hiberix	PRE	50	17	34,0	21,2	48,8	4	8,0	2,2	19,2	0,153	0,112	0,209	
	PIII	50	48	96,0	86,3	99,5	36	72,0	57,5	83,8	3,014	1,846	4,920	

N: número de sujetos con resultados disponibles
 %: porcentaje de sujetos con concentración anti-PRP superior al corte especificado de 95 % de CI; LL, UL: intervalo de confianza del 95 %; limite inferior y superior

Tabla 2: Porcentaje de sujetos seroprotectidos y respuesta de vacuna a antígenos de la tos ferina después de una vacunación primario (cohorte de ATP para inmunogenicidad)												
	DTPa-HBV-IPV/HibPLG			DTPa-HBV-IPV/Hib			DTPa-HBV-IPV + Hiberix					
	N	%	CI 95 %	N	%	CI 95 %	N	%	CI 95 %			
			LL	UL		LL	UL		LL	UL		
Seroprotección												
Anti-D (≥ 0.1 IU/ml)	48	97,9	88,9	99,9	49	100	92,7	100	50	100	92,9	100
Anti-T (≥ 0.1 IU/ml)	47	100	92,5	100	49	100	92,7	100	50	100	92,9	100
Anti-HBs (≥ 10 mIU/ml)	47	100	92,5	100	49	100	92,7	100	50	98,0	89,4	99,9
Anti-polio 1 (≥ 8)	33	100	89,4	100	41	100	91,4	100	41	100	91,4	100
Anti-polio 2 (≥ 8)	34	100	89,7	100	39	97,4	86,5	99,9	36	100	90,3	100
Anti-polio 3 (≥ 8)	32	100	89,1	100	34	100	89,7	100	33	100	89,4	100
Respuesta de vacuna												
Anti-PT	48	100	92,	100	48	97,9	88,9	99,9	48	93,8	82,8	98,7
Anti-FHA	48	89,6	77,3	96,5	49	93,9	83,1	98,7	50	90,0	78,2	96,7
Anti-PRN	48	91,7	. □□	97,7	49	95,9	86	99,5	50	90,0	78,2	96,7
N: número de sujetos con % de resultados disponible %: porcentaje de sujetos seroprotectidos o con CI del 95 % de respuesta de vacuna; LL, UL: intervalo de confianza del 95 %; límite inferior y superior												

Resultados de seguridad: Las incidencias de cualquier síntoma local o general fueron comparables entre los tres grupos de estudio. Las incidencias no aumentaron en el grupo que recibió DTPa-HBV-IPV/HibPLG en comparación con los otros tres grupos de estudio. No se informó de fiebre (temperatura rectal) superior a 39,5 °C en ninguno de los grupos. No se informó de fiebre (temperatura rectal) superior a 39,0°C en el grupo de DTPa-HBV-IPV/HibPLG.

Eventos adversos graves: Se informó de once SAE durante el transcurso del estudio. Ninguno de los mismos se relacionó causalmente con la vacunación por parte del investigador.

Conclusiones:

- 5 • La respuesta a Hib después de la vacunación con DTPa-HBV-IPV/HibPLG fue significativamente superior en comparación con DTPa-HBV-IPV/Hib y no fue diferente de la de la vacuna de conjugado Hib independiente Hiberix. Por lo tanto, no se observaron problemas de interferencia inmunitaria de Hib con la nueva formulación.
- 10 • La respuesta a los antígenos adicionales administrados fue similar a la de DTPa-HBV-IPV/Hib y a la de DTPa-HB V-IPV en términos de tasas de seroprotección y respuestas a vacuna. Los antígenos adicionales parecen ser compatibles con PLG como un excipiente de vacuna. Aunque las valoraciones de GMC frente a pertactina y IPV de tipo I se redujeron para DTPa-HBV-IPV/HibPLG en comparación con DTPa-HBV-IPV/Hib (no obstante, fueron más similares a las valoraciones para el grupo de DTPa-HBV-IPV + Hib), la respuesta de vacuna a pertactina y las tasas de seroprotección para IPV de tipo I para todas las vacunas fueron comparables.
- La DTPa-HBV-IPV/HibPLG mostró una reactogenicidad comparable a la de la vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición inmunógena que comprende un polisacárido o un oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP) y un polímero polianiónico, en la que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas del grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico.
- 2.** La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que el PRP está conjugado a una proteína vehículo que es una fuente de epítopes de linfocitos T cooperadores.
- 10 **3.** La composición inmunógena de la reivindicación 2, en la que la proteína vehículo es seleccionada del grupo que consiste en: toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, CRM197 y proteína D.
- 4.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-3, en la que el polímero polianiónico consiste en unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico .
- 15 **5.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-4, en la que el oligopéptido o el polipéptido consiste en, en promedio, 15-18 residuos, del modo más preferente 17 residuos.
- 6.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-5, en la que el polímero polianiónico es un heteropolímero polianiónico.
- 20 **7.** La composición inmunógena de la reivindicación 6, en la que el heteropolímero polianiónico consiste en dos unidades de repetición constitucionales aniónicas distintas.
- 8.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-5, en la que el polímero polianiónico es un homopolímero polianiónico.
- 9.** La composición inmunógena de la reivindicación 8, en la que el polímero polianiónico es poli(ácido L-glutámico) (PLG).
- 25 **10.** La composición inmunógena de la reivindicación 7, en la que el polímero polianiónico es poli(ácido L-aspártico) (PLA).
- 30 **11.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-10, en la que el resultado de multiplicar la concentración del polímero polianiónico (en μM) por la carga negativa neta del polímero polianiónico a pH 7,0 dividido por la cantidad de PRP presente en una dosis de 0,5 ml de la composición inmunógena (en μg) es 300-6000, preferentemente 400-4000, más preferentemente 500-2000, 560-1100, 610-900, 640-800 o 660-700 y del modo más preferente aproximada o exactamente 680.
- 12.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-11, en la que la concentración del polímero polianiónico en la composición es 30-2000 en μM .
- 35 **13.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-12, en la que el polímero polianiónico tiene una carga negativa neta a pH 7,0, en promedio, de al menos 8 y preferentemente de al menos 17.
- 14.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-13, en la que el polímero polianiónico tiene al menos en promedio 1 carga negativa neta a pH 7,0 para 3 monómeros, preferentemente al menos 2 para 3 monómeros y del modo más preferente al menos, en promedio, 1 carga negativa neta para cada monómero.
- 40 **15.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-14, en la que la cantidad de PRP presente en una dosis de 0,5 ml de la composición inmunógena es 1-20, preferentemente de 2,5-10 y del modo más preferente aproximada o exactamente 5 μg .
- 16.** La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-15, en la que la composición inmunógena comprende uno o más antígenos adicionales.
- 45 **17.** La composición inmunógena de la reivindicación 16, en la que los, uno o más, antígenos adicionales comprenden uno o más conjugados de oligosacárido o polisacárido capsular de meningococos – proteína vehículo seleccionados del grupo que consiste en: *N. meningitidis* serogrupo C (MenC), *N. meningitidis* serogrupo Y (MenY), *N. meningitidis* serogrupo A (MenA) y *N. meningitidis* serogrupo W (MenW), preferentemente MenC y/o MenY.
- 18.** La composición inmunógena de la reivindicación 16 o 17, en la que los, uno o más, antígenos adicionales comprenden uno o más conjugados de oligosacárido o polisacárido capsular de neumococos – proteína vehículo.

19. La composición inmunógena de la reivindicación 17 o 18, en la que la proteína vehículo es seleccionada del grupo que consiste en: toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, CRM197 y proteína D.
- 5 20. La composición inmunógena de las reivindicaciones 16-19, en la que los, uno o más, antígenos adicionales comprenden toxoide del tétanos, toxoide de la difteria y antígenos de *B. pertussis* de célula completa inactivada o uno o más antígenos de *B. pertussis* no celulares.
21. La composición inmunógena de las reivindicaciones 16-20, en la que los, uno o más, antígenos adicionales comprenden uno o más antígenos de *B. pertussis* no celulares seleccionados del grupo que consiste en: toxoide de la tos ferina, hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina, aglutinógeno 2 y aglutinógeno 3.
- 10 22. La composición inmunógena de las reivindicaciones 16-21, en la que los, uno o más, antígenos adicionales comprenden uno o ambos de vacuna de la polio inactivada (IPV) y antígeno de superficie de la hepatitis B, en la que el antígeno de superficie de la hepatitis B está preferentemente adsorbido en fosfato de aluminio.
23. La composición inmunógena de las reivindicaciones 16-22, que comprende adicionalmente un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8; en la que el polímero polianiónico evita la floculación entre el coadyuvante y el PRP y/o reduce la interferencia inmunológica que el coadyuvante tiene sobre el PRP.
- 15 24. La composición inmunógena de la reivindicación 23, en la que el coadyuvante es seleccionado del grupo que consiste en: alumbre e hidróxido de aluminio.
25. La composición inmunógena de la reivindicación 23 o 24, en la que el coadyuvante está presente en la composición inmunógena en la cantidad de 100-1000 µg por 0,5 ml de dosis.
- 20 26. La composición inmunógena de las reivindicaciones 23-25, en la que al menos uno de los, uno o más, antígenos adicionales está adsorbido en el coadyuvante.
27. La composición inmunógena de la reivindicación 26, en la que la presencia del polímero polianiónico no provoca una desorción significativa de los, uno o más, antígenos adicionales adsorbidos en el coadyuvante.
28. La composición inmunógena de la reivindicación 26 o 27, que comprende los antígenos siguientes adsorbidos en hidróxido de aluminio: toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, toxoide de la tos ferina, FHA y pertactina.
- 25 29. La composición inmunógena de la reivindicación 28, que comprende adicionalmente IPV sin adsorber y/o antígeno de superficie de la hepatitis B adsorbido en fosfato de aluminio.
- 30 30. La composición inmunógena de las reivindicaciones 1-29, que está liofilizada y que comprende adicionalmente un excipiente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en: glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, sorbitol, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinita, trehalosa, rafinosa, estaquiosa y melecitosa; preferentemente sacarosa.
31. La composición inmunógena según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en la que la polidispersidad del polímero polianiónico es inferior a 3.
32. Una vacuna que comprende la composición inmunógena de las reivindicaciones 1-31 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 33. El uso de la composición inmunógena de las reivindicaciones 1-31 o la vacuna de la reivindicación 32, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad provocada por *H. influenzae* B.
- 40 34. Un procedimiento para reducir la interferencia inmunológica de un polisacárido o un oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP), preferentemente conjugado, en una vacuna de combinación que comprende uno o más antígenos adicionales adsorbidos en un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:
- (i) adsorber los, uno o más, antígenos adicionales en el coadyuvante;
- (ii) añadir un polímero polianiónico a dichos, uno o más, antígenos adicionales, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio 8-117 residuos y que comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspartico y/o ácido L-glutámico; y
- 45 (iii) después añadir una composición inmunógena que comprende PRP a dichos, uno o más, antígenos adicionales.

35. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que la vacuna de combinación es la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 23-31.
- 5 36. Un procedimiento para reducir la interferencia inmunológica de un polisacárido u oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP), preferentemente conjugado, en una vacuna de combinación que comprende uno o más antígenos adicionales adsorbidos a un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:
- (i) adsorber los, uno o más, antígenos adicionales en el coadyuvante; y
- (ii) añadir una composición inmunógena que comprende PRP y un polímero polianiónico a dichos, uno o más, antígenos adicionales, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y que comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico.
- 10 37. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que la composición inmunógena es la de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
- 15 38. El procedimiento de la reivindicación 36 o 37, en el que la vacuna de combinación es la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 23-31.
39. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 34-38, en el que la composición inmunógena es añadida extemporáneamente a dichos, uno o más, antígenos adicionales.
- 20 40. El procedimiento de las reivindicaciones 34-36, en el que la composición inmunógena es liofilizada en presencia de un excipiente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en: glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, sorbitol, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinita, trehalosa, rafinosa, estaquiosa y melecitosa; preferentemente sacarosa.
- 25 41. El procedimiento de las reivindicaciones 34-40, en el que la composición inmunógena comprende adicionalmente uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de meningococos conjugados seleccionados de un grupo que consiste en: MenC, MenY, MenA y MenW, preferentemente MenC y/o MenY.
42. El procedimiento de las reivindicaciones 34-41, en el que la composición inmunógena comprende adicionalmente uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de neumococos conjugados.
43. El procedimiento de las reivindicaciones 34-42, en el que el coadyuvante es hidróxido de aluminio.
- 30 44. El procedimiento de las reivindicaciones 34-41, en el que el, uno o más, antígenos adicionales comprenden los antígenos siguientes: toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, toxoide de la tos ferina, FHA y pertactina.
45. El procedimiento de las reivindicaciones 34-42, en el que la presencia del polímero polianiónico en la vacuna de combinación no provoca una desorción significativa de los, uno o más, antígenos adicionales adsorbidos en el coadyuvante.
- 35 46. Un kit que comprende: i) una primera composición inmunógena que comprende un polisacárido u oligosacárido capsular de *Haemophilus influenzae* B (PRP), preferentemente conjugado, y un polímero polianiónico, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspártico y/o de ácido L-glutámico; y ii) una segunda composición inmunógena que comprende uno o más antígenos adsorbidos en un coadyuvante con una carga de punto cero superior a 8.
- 40 47. El kit de la reivindicación 46, en el que la primera composición inmunógena es la composición inmunógena de las reivindicaciones 1-22.
- 45 48. El kit de la reivindicación 46 o 47, en el que la primera composición inmunógena está liofilizada y comprende adicionalmente un excipiente estabilizante, preferentemente sacarosa, y la segunda composición inmunógena es líquida.
49. El kit de la reivindicación 46 o 47, en la que la primera composición inmunógena es líquida y la segunda composición inmunógena es líquida.
- 50 50. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 46-49, en el que la primera composición inmunógena es para la adición extemporánea a la segunda composición inmunógena.

51. El kit de las reivindicaciones 46-50, en el que la primera composición inmunógena comprende adicionalmente uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de meningococos conjugados seleccionados de un grupo que consiste en: MenC, MenY, MenA y MenW, preferentemente MenC y/o MenY.
52. El kit de las reivindicaciones 46-51, en el que la primera composición inmunógena comprende adicionalmente uno o más oligosacáridos o polisacáridos capsulares de neumococos conjugados.
53. El kit de las reivindicaciones 46-52, en el que el coadyuvante es hidróxido de aluminio.
54. El kit de las reivindicaciones 46-53, en el que la segunda composición inmunógena comprende uno o más antígenos seleccionados de un grupo que consiste en: toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, toxoide de la tos ferina, FHA y pertactina.
- 10 55. El uso de un polímero polianiónico en la fabricación de una composición inmunógena para evitar que tenga lugar una agregación o una floculación en dicha composición, en el que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspartico y/o de ácido L-glutámico.
- 15
56. Una composición inmunógena que comprende un antígeno sacárido con un pI inferior a 3 y un polímero polianiónico, en la que el polímero polianiónico es un oligopéptido o un polipéptido que consiste en, en promedio, 8-117 residuos y comprende unidades de repetición constitucionales aniónicas obtenidas de un grupo que consiste en: ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico y sales de los anteriores y que tiene un contenido de monómero no inferior al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de ácido L-aspartico y/o de ácido L-glutámico.
- 20

Figura 1: Presaturación de Al(OH)₃ con PLG (106 residuos)

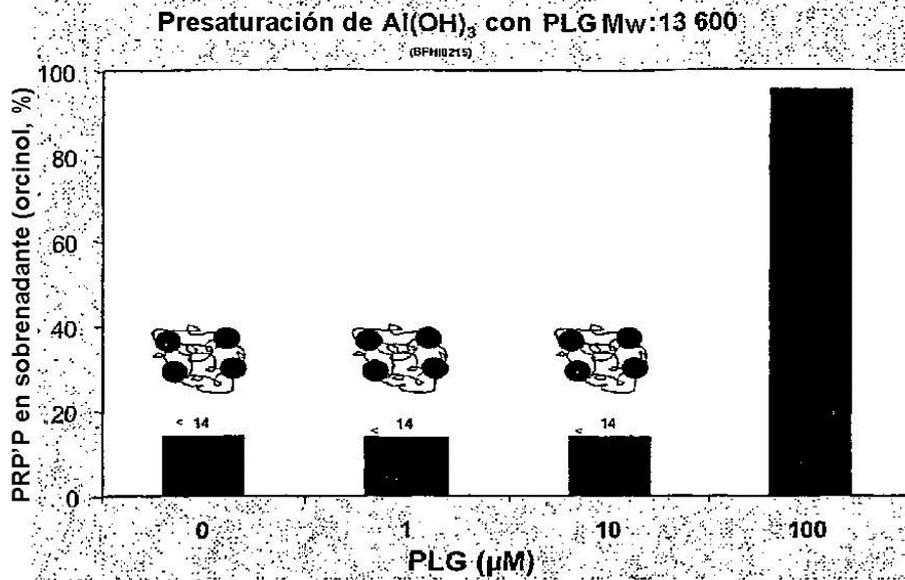
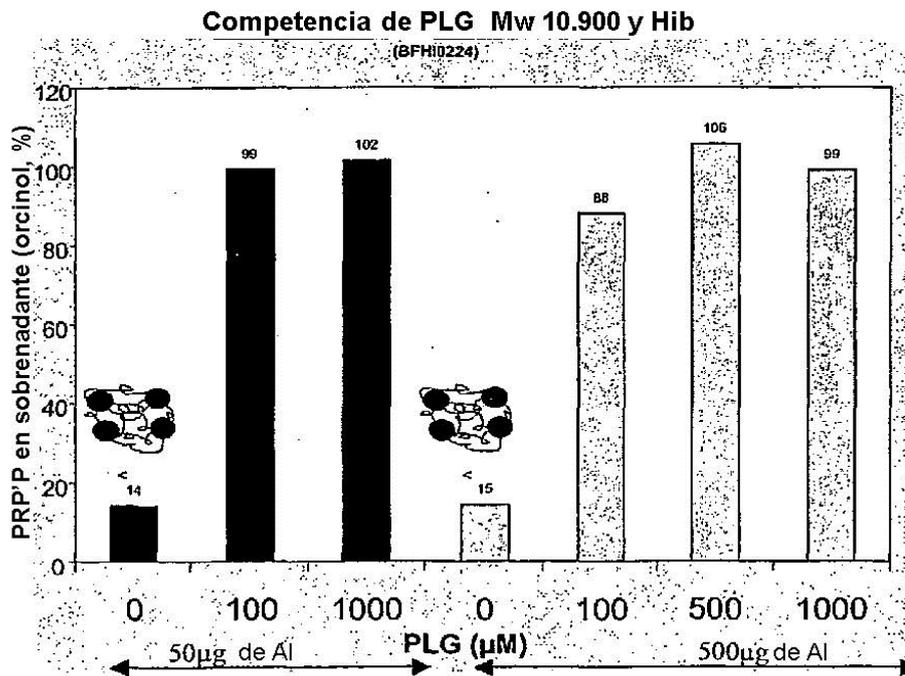


Figura 2: Competencia entre PRP-T y PLG (85 residuos)



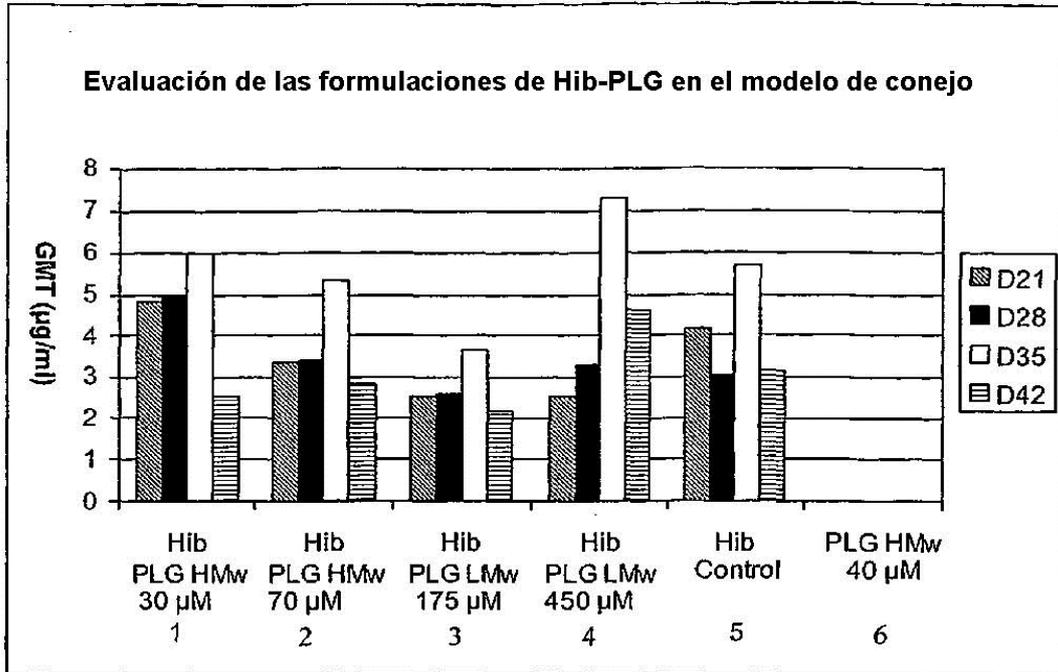


Figura 3

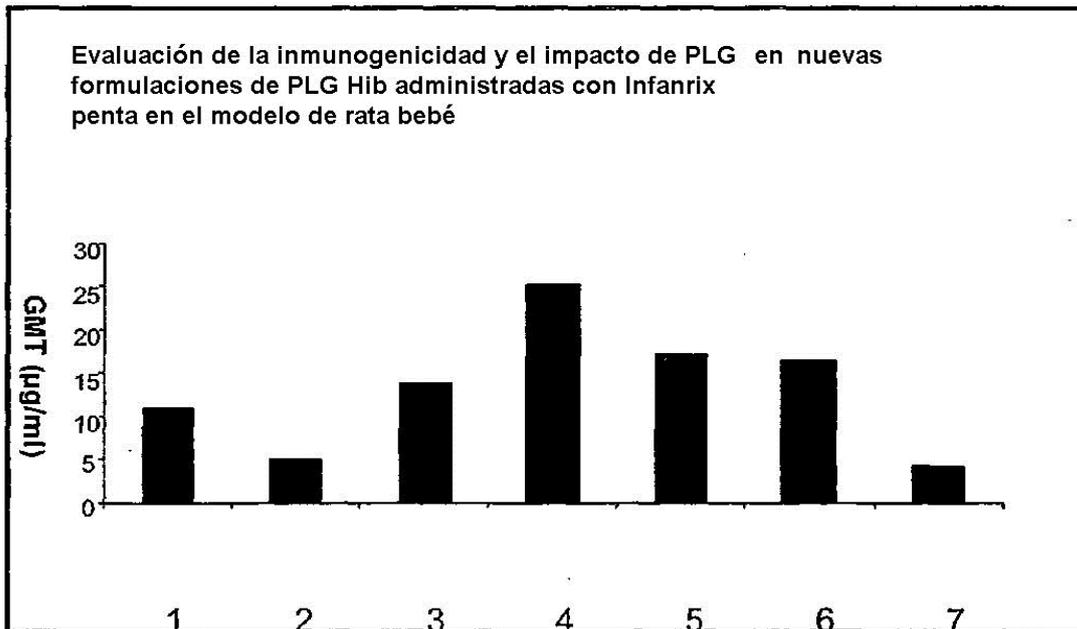


Figura 4

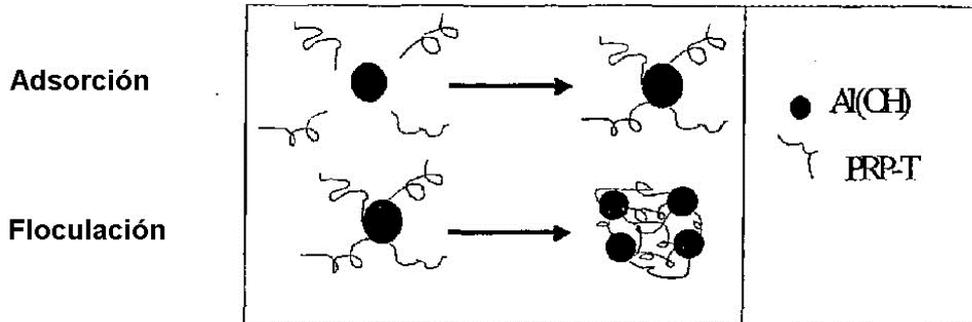


Figura 5: Representación esquemática de la adsorción y la floculación

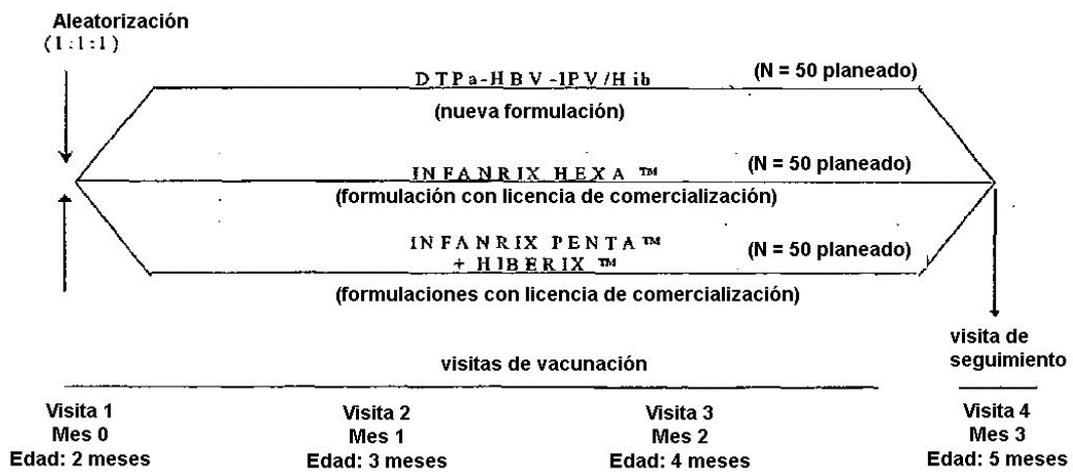


Figura 6: Esquema de ensayo clínico

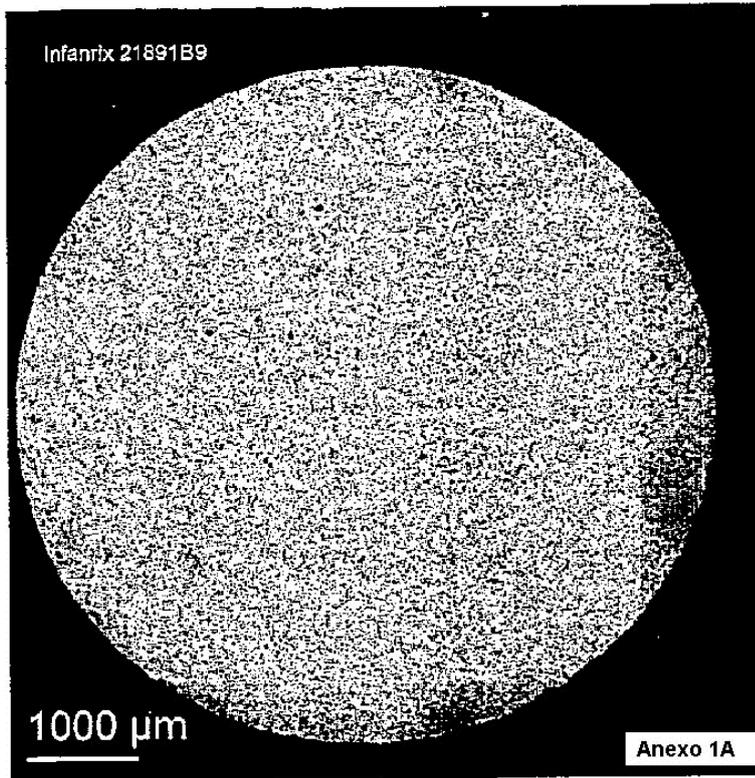


Figura 7

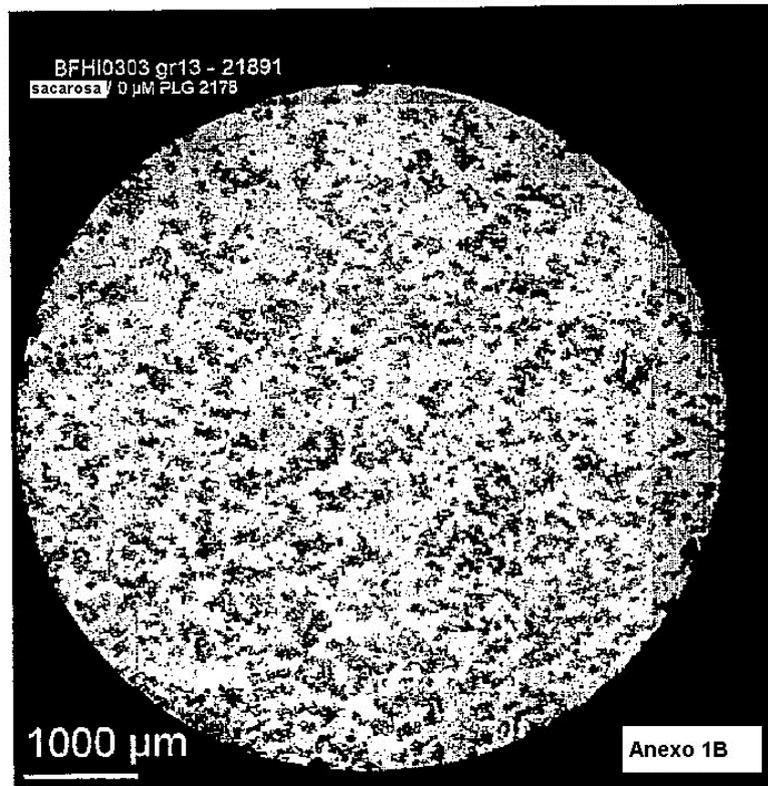


Figura 8

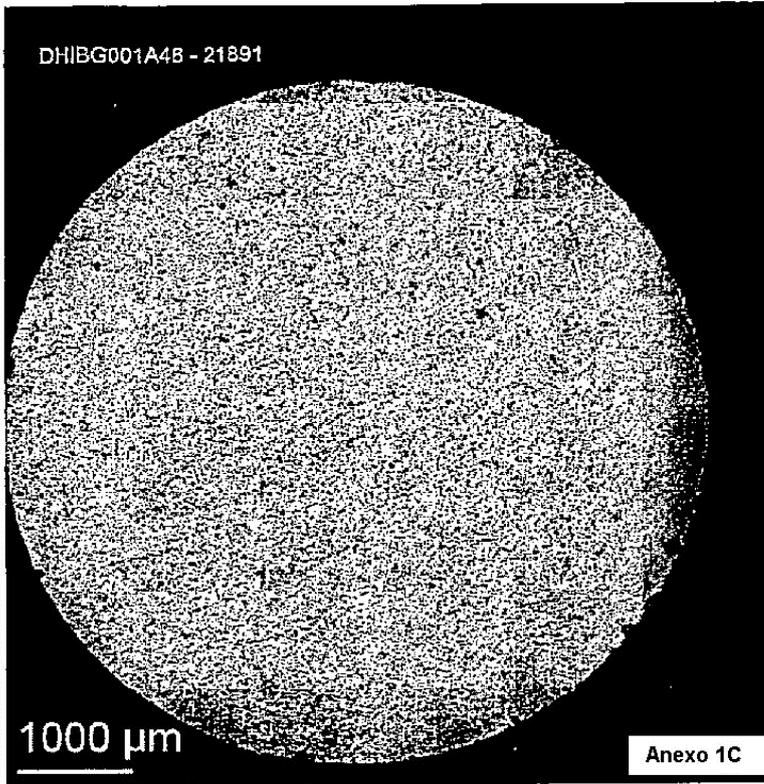


Figura 9

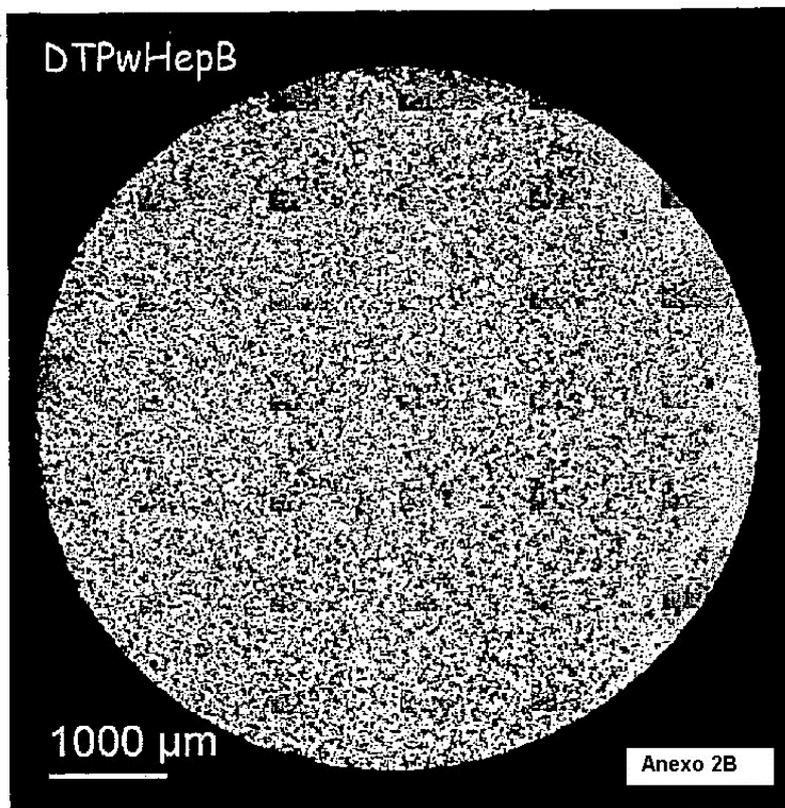


Figura 10

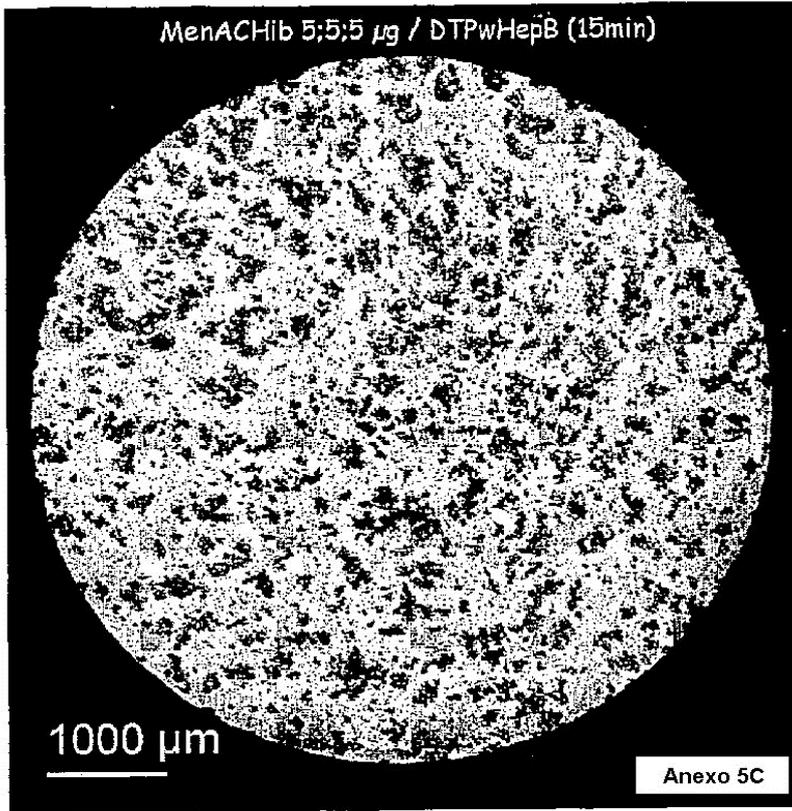


Figura 11

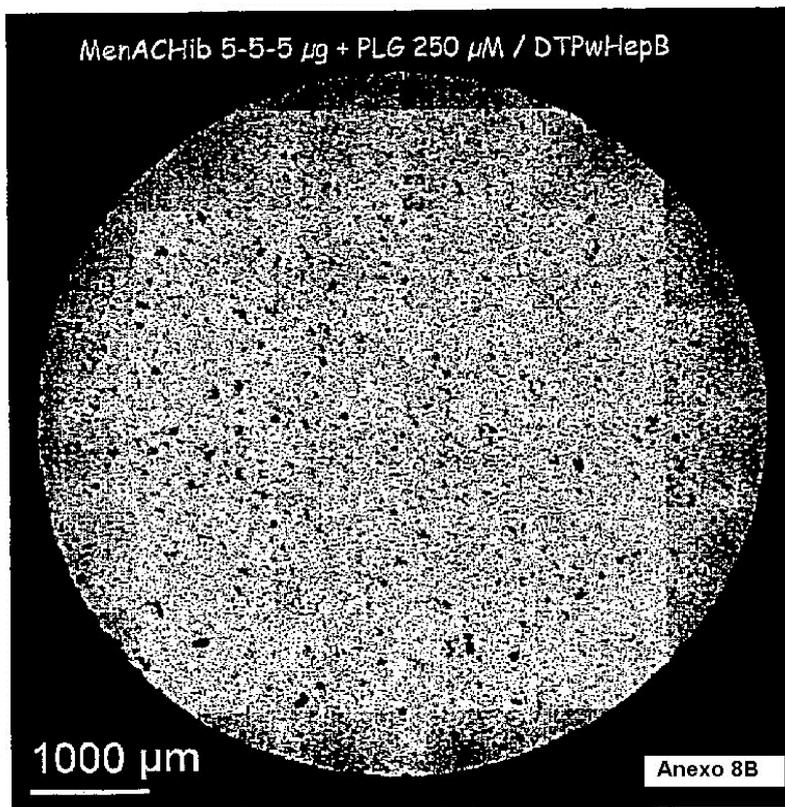


Figura 12