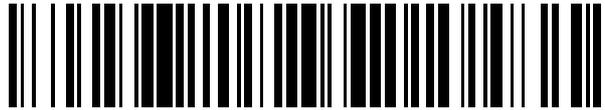


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 979**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2002 E 10183565 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2332581**

54 Título: **Vacuna de conjugado de polisacárido-CRM197 meningocócica tri- o tetravalente**

30 Prioridad:

23.01.2001 US 263435 P

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

07.09.2015

73 Titular/es:

**SANOFI PASTEUR INC. (100.0%)
Discovery Drive
Swiftwater, PA 18370-0187, US**

72 Inventor/es:

RYALL, ROBERT

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 544 979 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de conjugado de polisacárido-CRM197 meningocócica tri- o tetravalente.

5 La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud provisional US nº 60/263.435, presentada el 23 de enero de 2001.

Antecedentes de la invención**10 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de medicina en general, y más específicamente a microbiología, inmunología, vacunas y a la prevención de infección por un patógeno bacteriano mediante inmunización.

15 Sumario de la técnica relacionada

Neisseria meningitidis es una causa principal de la meningitis bacteriana y septicemia en todo el mundo. La incidencia de la enfermedad meningocócica endémica durante los últimos treinta años oscila desde 1 a 5 por 100.000 en el mundo desarrollado, y de 10 a 25 por 100.000 en los países en desarrollo (Reido, F.X., *et al.* 1995). Durante la epidemia, la incidencia de la enfermedad meningocócica se aproxima a 1000 por 100.000. Hay aproximadamente 2.600 casos de meningitis bacteriana por año en los Estados Unidos de América, y de media 330.000 casos en los países en desarrollo. La tasa de mortalidad de los casos oscila entre 10 y 20%.

25 Los meningococos patógenos están encerrados por una cápsula de polisacárido que se une a la superficie de la membrana exterior del organismo. Se han identificado trece serogrupos diferentes de meningococos basándose en la especificidad inmunológica del polisacárido capsular (Frasch, C.E., *et al.* 1985). De estos trece serogrupos, cinco provocan la mayoría de la enfermedad meningocócica; estos incluyen los serogrupos A, B, C, W135, e Y. El serogrupo A es responsable de la mayoría de las enfermedades epidémicas. Los serogrupos B, C e Y provocan la mayoría de las enfermedades endémicas y epidemias localizadas.

30 La mucosa naso-ufaríngea humana es el único depósito natural conocido de *Neisseria meningitidis*. La colonización tiene lugar tanto en la superficie exterior de las células mucosales como en el tejido subepitelial de la nasofaringe. La carga de meningococos puede durar meses. La diseminación de los meningococos se produce mediante contacto directo o por día de gotitas de aire. Los meningococos se hacen invisibles al pasar a través del epitelio mucosal vía vacuolas fagocíticas como resultado de la endocitosis. La defensa del hospedante frente a meningococos invasivos depende de la bacteriolisis mediada por el complemento. Los anticuerpos del suero que son responsables de la bacteriolisis mediada por el complemento están dirigidos en gran parte frente al polisacárido exterior capsular.

40 Se han descrito vacunas basadas en el polisacárido meningocócico, que provocan una respuesta inmunitaria frente al polisacárido capsular. Estos anticuerpos son capaces de llevar a cabo la bacteriolisis de los meningococos específicos de serogrupos mediada por el complemento. Se demostró que las vacunas de polisacáridos meningocócicos son eficaces en niños y adultos (Peltola, H., *et al.* 1977 y Artenstein, M.S., *et al.* 1970), pero la eficacia estaba limitada a lactantes y niños de corta edad (Reingold, A.L., *et al.* 1985). Las dosis subsiguientes del polisacárido en poblaciones más jóvenes provocaron una respuesta débil o ninguna respuesta de refuerzo (Goldschneider, I., *et al.* 1973 y Gold, R., *et al.* 1977). La duración de la protección provocada por las vacunas del polisacárido meningocócico no es duradera, y se ha estimado que está entre 3 y 5 años en adultos y en niños antes de los cuatro años de edad (Brandt, B., *et al.* 1975, Käyhty, H., *et al.* 1980, y Ceesay, S. J., *et al.* 1993). Para niños de uno a cuatro años de edad, la duración de la protección es menor de tres años (Reingold, A.L., *et al.* 1985).

50 Los polisacáridos son incapaces de unirse a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, un prerrequisito para la presentación de antígenos a y la estimulación de linfocitos T auxiliares, es decir, son antígenos independientes de las células T. Los polisacáridos son capaces de estimular linfocitos B para la producción de anticuerpos sin la ayuda de linfocitos T auxiliares. Como resultado de la estimulación de los linfocitos B independiente de T, hay una falta de inducción de memoria tras la inmunización mediante estos antígenos. Los antígenos de polisacáridos son capaces de provocar respuestas muy eficaces independientes de T en adultos, pero estas respuestas independientes de T son débiles en el sistema inmunitario inmaduro de lactantes y niños de corta edad.

60 Los antígenos de polisacáridos independientes de T se pueden convertir en antígenos dependientes de T mediante unión covalente de los polisacáridos a moléculas proteicas ("portadoras" o "proteínas portadoras"). Las células B que se unen al componente de polisacárido de la vacuna conjugada se pueden activar mediante células T auxiliares específicas para péptidos que son parte de la proteína portadora conjugada. La respuesta T auxiliar a la proteína portadora sirve para aumentar la producción de anticuerpos frente al polisacárido.

65 Se ha demostrado que el polisacárido del serogrupo B es pobremente inmunógeno a nada inmunógeno en la

población humana (Wyle, F.A., *et al.* 1972). La unión química del polisacárido de este grupo a proteínas no ha alterado significativamente la respuesta inmunitaria en animales de laboratorio (Jennings, H. J., *et al.* 1981). Se piensa que la razón para la falta de respuesta inmunitaria al polisacárido de este grupo surge de las similitudes estructurales entre el polisacárido del serogrupo B y las glucoproteínas del hospedante polisialiladas, tales como las moléculas de adhesión de células neuronales.

Se ha descrito una vacuna conjugada meningocócica basada en el polisacárido del serogrupo C. Esta vacuna monovalente provoca una fuerte respuesta de anticuerpo funcional frente al polisacárido capsular presente en cepas de *N. meningitidis* que corresponden al serogrupo C. Tal vacuna sólo es capaz de proteger frente a la enfermedad provocada por bacterias del serogrupo C.

Es divulgada una vacuna conjugada de toxoide diftérico de polisacárido C + antimeningocócica A (MenD) por Campagne G.. *et al.* (Pediatric Infectious Disease Journal (2000): 19, 144-150). Se descubrió que MenD resultaba segura entre los niños de pecho en Níger, y la inmunización conduce a una actividad de anticuerpo funcional significativamente superior a la vacuna de polisacárido correspondiente.

Lei Q. P. *et al.* (Developments in biologicals (2000): 103, 259-264) divulgan una vacuna conjugada tetravalente que comprende polisacáridos preparados a partir de los serotipos de *Neisseria meningitidis* A, C, W135 e Y conjugados individualmente al toxoide diftérico. Se describe un procedimiento de precipitación que utiliza desoxicolato/HCl, que separa de manera eficaz polisacáridos libres y ligados en una vacuna de conjugado tetravalente.

Lamb D. H. *et al.* (Developments in biologicals (2000): 103, 251-258) describen un análisis electroforético capilar de la vacuna de conjugado de toxoide diftérico-polisacáridos antimeningocócica.

Perkins B. A. (Journal of the American Medical Association (2000): 283, 2842-2843) describe las vacunas de polisacáridos antimeningocócicas disponibles así como las vacunas conjugadas antimeningocócicas que se han desarrollado y que resulta necesario desarrollar, de entre las cuales una vacuna conjugada de A, C, W135 e Y.

Las vacunas existentes basadas en polisacárido meningocócico son de uso limitado en niños de corta edad, y no proporcionan protección duradera en adultos. La única vacuna meningocócica que se ha demostrado que es capaz de provocar una protección duradera en todos los grupos, incluyendo niños, con riesgo de infección meningocócica se basa en un polisacárido procedente de un único serogrupo de *N. meningitidis*, y no proporciona protección frente a la infección por otros serogrupos. De este modo, existe la necesidad de una vacuna conjugada meningocócica capaz de conferir protección amplia y duradera frente a enfermedad meningocócica en niños y adultos con riesgo de infección meningocócica. Los polisacáridos meningocócicos multivalentes de la presente invención resuelven esta necesidad al proporcionar formulaciones de vacunas en las que los polisacáridos inmunógenos procedentes de los principales grupos patógenos de *N. meningitidis* se han convertido en antígenos dependientes de T a través de conjugaciones a proteínas portadoras.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una vacuna meningocócica polivalente que comprende unas cantidades eficaces inmunológicamente de tres o cuatro conjugados de proteína-polisacárido distintos para su utilización en la protección de un ser humano contra una infección por *N. meningitidis*, en la que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y en la que cada polisacárido capsular es seleccionado de entre el grupo que consiste en polisacáridos capsulares a partir de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*, en la que además:

(i) la proteína portadora es CRM197; y

(ii) cuando existen cuatro conjugados de proteína-polisacárido distintos, cada uno de dichos polisacáridos está despolimerizado parcialmente.

Además, la presente invención proporciona un método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis*, caracterizado por que son utilizados tres o cuatro conjugados de proteína-polisacárido distintos, comprendiendo dicho método preparar por separado los conjugados y combinar a continuación los conjugados en una composición inmunológica, en el que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora y en el que cada polisacárido capsular es seleccionado de entre el grupo que consiste en polisacáridos capsulares a partir de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*, en el que además:

(i) la proteína portadora es CRM197; y

(ii) cuando existen cuatro conjugados de proteína-polisacárido distintos, dicho método comprende la despolimerización parcial de los polisacáridos antes de la conjugación.

También se describen en la presente memoria composiciones inmunológicas que comprenden dos o más conjugados de proteína-polisacárido, en los que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular procedente de *N. meningitidis* conjugado con una proteína portadora.

- 5 Se describen además en la presente memoria composiciones inmunológicas que comprenden dos o más conjugados distintos de proteína-polisacárido, en las que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular procedente de un serogrupo diferente de *N. meningitidis* conjugado a una proteína portadora.

10 La presente divulgación proporciona vacunas para conjugados meningocócicos de polisacárido-proteína provocados por *Neisseria meningitidis* patógena. La presente divulgación proporciona vacunas meningocócicas polivalentes que comprenden cantidades inmunológicamente eficaces de cuatro conjugados distintos de proteína-polisacárido, en las que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y en las que cada polisacárido capsular se selecciona de entre el grupo que consiste en polisacárido capsular procedente de los serogrupos A, C, W-135 e Y, en las que la proteína portadora es toxoide diftérico o CRM197.

15 Se describen en la presente memoria métodos para fabricar una composición meningocócica polivalente de polisacárido-proteína, que comprende purificar dos o más polisacáridos capsulares procedentes de *Neisseria meningitidis* patógena; conjugar los polisacáridos purificados a una o más proteínas portadoras, y combinar los conjugados para obtener la composición meningocócica polivalente de polisacárido-proteína.

20 Se describe en la presente memoria un método para inducir una respuesta inmunológica frente al polisacárido capsular de *N. meningitidis*, que comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunológica de la invención a un ser humano o animal.

25 Se describe en la presente memoria un método para proteger un ser humano o animal susceptible a la infección por *N. meningitidis*, que comprende administrar una dosis inmunológicamente eficaz de la vacuna de la invención al ser humano o animal.

30 Descripción detallada de la invención

Se describe en la presente memoria una composición inmunológica de dos o más conjugados distintos de proteína-polisacárido, en la que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular conjugado a una proteína portadora. De este modo, se describen composiciones que comprenden dos o más polisacáridos capsulares diferentes conjugados a una o más proteínas portadoras.

35 Los polisacáridos capsulares se pueden preparar mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia (ref.). En la presente invención, los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.

40 En una forma de realización preferida, estos conjugados de serogrupos meningocócicos se preparan mediante procedimientos separados y se formulan en una única formulación farmacéutica. Por ejemplo, los polisacáridos capsulares procedentes de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis* se purifican de forma separada.

45 En las formas de realización de la presente invención en las que el polisacárido purificado se despolimeriza, puede activarse antes de la conjugación a una proteína portadora. En una forma de realización preferida de la presente invención, los polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis* se despolimerizan parcialmente usando condiciones oxidativas suaves.

50 La despolimerización o despolimerización parcial de los polisacáridos puede estar seguida entonces de una etapa de activación. Por "activación" se quiere decir tratamiento químico del polisacárido para proporcionar grupos químicos capaces de reaccionar con la proteína portadora. Un método de activación preferido implica el tratamiento con dihidrazida de ácido adípico en disolución salina fisiológica a pH $5,0 \pm 0,1$ durante aproximadamente dos horas a 15 a 30°C. En la patente US nº 5.965.714 se describe un procedimiento para la activación.

55 Una vez activados, los polisacáridos capsulares se pueden conjugar entonces a una o más proteínas portadoras. En una forma de realización preferida de la presente invención, cada polisacárido capsular se conjuga de forma separada a una sola especie de proteína portadora. En una forma de realización preferida, los polisacáridos capsulares procedentes de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis* se conjugan cada uno separadamente a la misma especie de proteína portadora.

60 Las proteínas portadoras son habitualmente toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide diftérico, CRM197, el toxoide tetánico, toxoide tosferínico, *E. coli* LT, *E. coli* ST, y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También se podrían usar proteínas de la membrana exterior bacteriana tales como el complejo c de la membrana exterior (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisis, proteína A de la superficie neumocócica (PspA), o proteína adhesinica neumocócica (PsaA). También se podrían usar como proteínas portadoras otras proteínas tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) o derivado

65

de proteína purificada de tuberculina (PPD). Las proteínas portadoras son preferentemente proteínas que no son tóxicas y no son reactogénicas, y son obtenibles en cantidad y pureza suficientes. Las proteínas portadoras deberían poder someterse a procedimientos de conjugación estándar. En una forma de realización preferida de la presente invención, se usa como proteína portadora la toxina diftérica purificada de cultivos de *Corynebacteria diphtheriae* y destoxificada químicamente usando formaldehído.

Tras la conjugación del polisacárido capsular a la proteína portadora, los conjugados de polisacárido-proteína se pueden purificar (enriquecer con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una variedad de técnicas. Una meta de la etapa de purificación es eliminar el polisacárido no unido del conjugado de polisacárido-proteína. En la patente US nº 6.146.902 se describe un método de purificación, que implica la ultrafiltración en presencia de sulfato de amonio. Como alternativa, los conjugados se pueden purificar de la proteína sin reaccionar y del polisacárido mediante cualquier número de técnicas estándar, incluyendo, entre otras, cromatografía de exclusión por tamaños, centrifugación por gradiente de densidad, cromatografía de interacción hidrófoba, o fraccionamiento con sulfato de amonio. Véase, por ejemplo, P.W. Anderson, *et al.* (1986). *J. Immunol.* 137: 1181-1186. Véase también H. J. Jennings y C. Lugowski (1981) *J. Immunol.* 127: 1011-1018.

Tras la conjugación del polisacárido y de la proteína portadora, las composiciones inmunológicas de la presente invención se obtienen combinando los diversos conjugados de polisacárido-proteína. Las composiciones inmunológicas descritas en la presente memoria comprenden dos o más polisacáridos capsulares diferentes conjugados a una o más proteínas portadoras. También se describe en la presente memoria una composición inmunológica bivalente que comprende polisacáridos capsulares procedentes de los serogrupos A y C de *N. meningitidis*, conjugados separadamente al toxoide diftérico. Más preferentemente, la presente invención es una composición inmunológica tetravalente que comprende polisacáridos capsulares procedentes de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*, conjugados separadamente al toxoide diftérico.

La preparación y uso de proteínas portadoras, y una variedad de procedimientos de conjugación potenciales, son bien conocidos por los expertos en la materia. Los conjugados de la presente invención se pueden preparar mediante tales personas expertas usando las enseñanzas contenidas en la presente invención, así como en información fácilmente disponible en la bibliografía general. También se puede obtener una guía a partir de una cualquiera o de todas las patentes US siguientes: US nº 4.356.170; US nº 4.619.828; US nº 5.153.312; US nº 5.422.427 y US nº 5.445.817.

Las composiciones inmunológicas de la presente invención se obtienen preparando separadamente conjugados de polisacárido-proteína a partir de serogrupos meningocócicos diferentes, y combinando después los conjugados. Las composiciones inmunológicas de la presente invención se usan como vacunas. La formulación de las vacunas de la presente invención se puede lograr usando métodos reconocidos en la técnica. Las composiciones de vacuna de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, a título de ejemplo y no de limitación, adyuvantes de aluminio, adyuvante de Freund, BAY, DC-chol, pcpp, monofosforil lípido A, CpG, QS-21, toxina del cólera y formil metionil péptido. Véase, por ejemplo, Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M.F. Powell y M. J. Newman, eds., Plenum Press, NY). El adyuvante es preferentemente un adyuvante de aluminio, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Como se demuestra a continuación, las vacunas según la invención provocan una respuesta inmunitaria de tipo dependiente de T en diversos modelos de animales, mientras que la vacuna de polisacárido provoca una respuesta inmunitaria de tipo independiente de T. De este modo, las composiciones descritas en la presente memoria también son herramientas de investigación útiles para estudiar las rutas y procesos biológicos implicados en las respuestas inmunitarias de tipo dependiente de T a los antígenos de *N. meningitidis*.

La cantidad de vacuna de la invención que se debe administrar a un ser humano o animal, y el régimen de administración, se puede determinar según técnicas estándar bien conocidas por los expertos en las técnicas farmacéutica y veterinaria, teniendo en cuenta factores como el antígeno particular, el adyuvante (si está presente), la edad, sexo, peso, especie y estado del animal o paciente particular, y la vía de administración. En la presente invención, la cantidad de polisacárido-proteína portadora para proporcionar una dosis eficaz para la vacunación frente a *N. meningitidis* puede estar entre alrededor de 0,02 µg y alrededor de 5 µg por kg de peso corporal. En una composición y método preferidos de la presente invención, la dosis está entre alrededor de 0,1 µg y 3 µg por kg de peso corporal. Por ejemplo, una dosis eficaz requerirá menos anticuerpo si el tiempo de post-infección transcurrido es menor, puesto que hay menos tiempo para que la bacteria proliferen. De manera similar, una dosis eficaz dependerá de la carga bacteriana en el momento del diagnóstico. Para uso terapéutico se podrían considerar múltiples inyecciones administradas durante un período de días.

Los conjugados polivalentes de la presente invención se pueden administrar como una única dosis o en serie (es decir, con una "revacunación" o "revacunaciones"). Por ejemplo, un niño podría recibir una dosis única muy temprana en la vida, y después se le podría administrar una dosis de refuerzo hasta diez años más tarde, según se recomienda actualmente para otras vacunas para prevenir enfermedades de la niñez.

La dosis de refuerzo generará anticuerpos a partir de células B sensibilizadas, es decir, una respuesta anamnésica.

5 Esto es, la vacuna del conjugado polivalente provoca una respuesta de anticuerpo funcional primaria elevada (es decir, tras una única administración de la vacuna) en poblaciones más jóvenes cuando se compara con la vacuna de polisacárido autorizada, y es capaz de provocar una respuesta anamnésica (es decir, tras una administración de refuerzo), demostrando que la respuesta inmunitaria protectora provocada por la vacuna del conjugado polivalente de la presente invención es de larga duración.

10 Las composiciones de la invención pueden incluir preparaciones líquidas para la administración a los orificios, por ejemplo oral, nasal, anal, vaginal, peroral, intragástrica, mucosal (por ejemplo perlingual, alveolar, gingival, mucosa olfativa o respiratoria), etc., tales como suspensiones, jarabes o elixires; y preparaciones para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), tales como suspensiones o emulsiones estériles. Se prefieren la administración intravenosa y la parenteral. Tales composiciones pueden estar en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, disolución salina fisiológica, glucosa, o similar. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, gelantes o aditivos que potencian la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes, colores, y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Para preparar preparaciones adecuadas sin experimentación innecesaria, se pueden consultar textos estándar, tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985.

20 Las composiciones de la invención usadas como vacunas se proporcionan convenientemente como preparaciones líquidas, por ejemplo disoluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones o composiciones viscosas que se pueden tamponar a un pH seleccionado. Si se prefiere la absorción por el tubo digestivo, las composiciones de la invención pueden estar en forma "sólida" de pastillas, comprimidos, cápsulas, cápsulas oblongas, y similares, incluyendo preparaciones "sólidas" que se liberan con el tiempo y que tienen un relleno líquido, por ejemplo líquido cubierto de gelatina, con lo que la gelatina se disuelve en el estómago para el suministro al intestino. Si se desea la administración nasal o respiratoria (mucosal), las composiciones pueden estar en forma y se pueden dispensar mediante un dispensador de pulverización de presión manual, un dispensador de bomba o un dispensador de aerosol. Los aerosoles están habitualmente a presión por medio de un hidrocarburo. Los dispensadores de bomba pueden dispensar preferentemente una dosis medida o una dosis que tiene un tamaño de partículas particular.

30 Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, que otras composiciones viscosas, y que las composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son en cierto modo más convenientes de administrar, especialmente mediante inyección u oralmente, a animales, niños, particularmente a niños pequeños, y a otros que pueden tener dificultad para tragar una pastilla, comprimido, cápsula o similar, o en situaciones de múltiples dosis. Por otro lado, las composiciones viscosas se pueden formular en el intervalo de viscosidad apropiada para proporcionar períodos más prolongados de contacto con la mucosa, tal como el forro del estómago o la mucosa nasal.

40 Obviamente, la elección de los vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y de la naturaleza de la forma de dosificación particular, por ejemplo forma de dosificación líquida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una disolución, una suspensión, un gel u otra forma líquida) o forma de dosificación sólida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una pastilla, comprimido, cápsula, cápsula oblonga, forma de liberación con el tiempo o forma llena de líquido).

45 Las disoluciones, suspensiones y geles contienen normalmente una cantidad importante de agua (por ejemplo agua pura) además del ingrediente activo. También pueden estar presentes cantidades pequeñas de otros ingredientes tales como agentes que ajustan el pH (por ejemplo, una base tal como NaOH), emulsionantes o agentes de dispersión, agentes tamponantes, conservantes, agentes humectantes, agentes gelificantes (por ejemplo, metilcelulosa), colores y/o sabores. Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y que el fluido lagrimal.

50 La isotonicidad deseada de las composiciones de esta invención se puede lograr usando tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio se prefiere particularmente para tampones que contienen iones sodio.

55 La viscosidad de las composiciones se puede mantener en el nivel seleccionado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere metilcelulosa debido a que está fácil y económicamente disponible, y es fácil de trabajar con ella. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma de xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbomer, y similar. La concentración preferida del agente espesante dependerá del agente seleccionado. El punto importante es usar una cantidad que logrará la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas se preparan normalmente a partir de disoluciones mediante la adición de tales agentes espesantes.

65 Para incrementar el período de caducidad de las composiciones, se puede emplear un conservante farmacéuticamente aceptable. Puede ser adecuado el alcohol bencílico, aunque también se puede emplear una variedad de conservantes, incluyendo, por ejemplo, parabenos, timerosal, clorobutanol, o cloruro de benzalconio.

Una concentración adecuada del conservante será de 0,02% a 2% basado en el peso total, aunque puede haber una variación apreciable dependiendo del agente seleccionado.

5 Los expertos en la materia reconocerán que los componentes de las composiciones se deben de seleccionar para que sean químicamente inertes con respecto a los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*-proteína portadora.

10 La invención se describirá adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos y no limitativos que exponen con detalle varias formas de realización preferidas del concepto inventivo. Otros ejemplos de esta invención resultarán evidentes para los expertos en la materia sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

15 Preparación de polvos de polisacáridos capsulares purificados de los serogrupos A, C, W-135, e Y de *Neisseria meningitidis*

20 Preparación de pasta bruta

De forma separada, se descongelaron cultivos de siembra congelados en húmedo de los serogrupos A, C, W-135, e Y de *Neisseria meningitidis*, y se recuperaron con la ayuda de medio líquido Watson Scherp y se plantaron en botellas de Blake que contienen medio de agar de Mueller Hinton. Las botellas de Blake se incubaron entre 35 y 37°C en una atmósfera de CO₂ durante 15 a 19 horas. Después del período de incubación, se descargó el crecimiento de las botellas de Blake y se añadió a matraces de 4 l que contienen medio de Watson Scherp. Los matraces se incubaron entre 35 y 37°C durante 3 a 7 horas en un agitador de plataforma. Los contenidos de los matraces de 4 l se transfirieron a una vasija fermentadora que contiene medio de Watson Scherp. La vasija fermentadora se incubó entre 35 y 37°C durante 7 a 12 horas, controlando el contenido de oxígeno disuelto y el pH con adiciones suplementarias de alimento y antiespumante. Después del período de incubación, los contenidos de la vasija fermentadora se transfirieron a un tanque de 500 l, se añadió Cetavlon, y el material se mezcló durante 1 hora. El crecimiento tratado con Cetavlon se centrifugó entre aproximadamente 15.000 y 17.000 x g a un caudal de aproximadamente 30 a 70 litros por hora. El polisacárido bruto se precipitó del sobrenadante con una segunda precipitación de Cetavlon. Se añadió Cetavlon al sobrenadante, y el material se mezcló durante por lo menos 1 hora a temperatura ambiente. El material se almacenó entre 1 y 5°C durante 8 a 12 horas. El polisacárido precipitado se recogió mediante centrifugación entre aproximadamente 45.000 y 50.000 x g, a un caudal de 300 y 400 ml por minuto. La pasta recogida se almacenó a -60°C o menos hasta que se procesó posteriormente.

Preparación de polvo de polisacárido purificado

40 La pasta inactivada se descongeló y se transfirió a una amasadora. La pasta se amasó con cloruro de calcio 0,9M para producir una suspensión homogénea. La suspensión se centrifugó a aproximadamente 10.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó a través de una almohadilla libre de fibra de algodón en un recipiente como el primer extracto. Se añadió a la pasta un segundo volumen de cloruro de calcio 0,9M, y se amasó para producir una suspensión homogénea. La suspensión se centrifugó como antes, y el sobrenadante se combinó con el sobrenadante procedente de la primera extracción. Se llevó a cabo un total de cuatro extracciones, y los sobrenadantes se reunieron. Los extractos reunidos se concentraron mediante ultrafiltración usando unidades de ultrafiltración enrolladas en espiral de 10-30 kDa de corte de peso molecular (MWCO).

50 Se añadió cloruro de magnesio al concentrado, y el pH se ajustó entre 7,2 y 7,5 usando hidróxido de sodio. Se añadieron ADNasa y ARNasa al concentrado, y se incubó entre 25 y 28°C con mezclado durante 4 horas. Se añadió etanol a una concentración de 30 a 50%. El ácido nucleico y la proteína precipitados se eliminaron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 2 horas. El sobrenadante se recuperó y el polisacárido se precipitó añadiendo etanol al 80% y dejando reposar toda la noche entre 1 y 5°C. El alcohol se eliminó por sifón, y el polisacárido precipitado se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 x g. El polisacárido precipitado se lavó con alcohol. El polisacárido se lavó con acetona, y se centrifugó entre 15 y 20 minutos a 10.000 x g. El polisacárido se secó a vacío. El polvo de polisacárido inicial se disolvió en disolución de acetato de sodio. Se añadió cloruro de magnesio, y el pH se ajustó entre 7,2 y 7,5 usando disolución de hidróxido sódico. Se añadieron ADNasa y ARNasa a la disolución, y se incubó entre 25 y 28°C con mezclado durante 4 horas para eliminar los ácidos nucleicos residuales. Después de la incubación con estas enzimas, se añadió un volumen igual de disolución de acetato de sodio-fenol a la mezcla de polisacárido-enzima, y se colocó en un agitador de plataforma entre 1 y 5°C durante aproximadamente 30 minutos. La mezcla se centrifugó a 10.000 x g durante 15 a 20 minutos. La capa acuosa superior se recuperó y se guardó. A la capa acuosa se añadió un volumen igual de disolución de acetato de sodio-fenol, y se extrajo como antes. Se llevó a cabo un total de cuatro extracciones para eliminar proteína y endotoxina de la disolución de polisacárido. Los extractos acuosos combinados se diluyeron hasta diez veces con agua para inyección, y se diafiltraron frente a 10 volúmenes de agua para inyección. Se añadió cloruro de calcio al polisacárido diafiltrado. El polisacárido se precipitó toda la noche entre 1 a 5°C añadiendo etanol hasta 80%. El sobrenadante alcohólico se

extrajo, y el polisacárido se recogió mediante centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos. El polisacárido purificado se lavó dos veces con etanol, y una vez con acetona. El polvo lavado se secó a vacío en un secador. El polvo seco se almacenó a -30°C o menos hasta que se procesó en el conjugado.

5 Ejemplo 2

Despolimerización de polvo de polisacárido capsular purificado de los serogrupos A, C, W-135, e Y de *Neisseria meningitidis*

10 Los materiales usados en la preparación incluyen polvos de polisacárido capsular purificado procedente de los serogrupos A, C, W-135, e Y de *Neisseria meningitidis* (preparados según el Ejemplo 1), tampón de acetato de sodio 50 mM estéril, pH 6,0, ácido clorhídrico 1N estéril, hidróxido sódico 1N estéril, peróxido de hidrógeno al 30%, y disolución salina fisiológica estéril (cloruro de sodio al 0,85%).

15 Cada polisacárido de los serogrupos se despolimerizó en una reacción separada. Se cargó un tanque de acero inoxidable con hasta 60 g de polvo de polisacárido capsular purificado. Se añadió tampón de acetato de sodio 50 mM estéril, pH 6,0, al polisacárido para producir una concentración de 2,5 g de polisacárido por litro. La disolución de polisacárido se dejó mezclar entre 1 y 5°C durante 12 a 24 horas para llevar a cabo la disolución. El tanque de reacción se conectó a una unidad intercambiadora de calor. Se añadió tampón de acetato de sodio 50 mM adicional, pH 6,0, para diluir el polisacárido hasta la concentración de reacción de 1,25 g por litro. La disolución de polisacárido se calentó hasta 55°C ± 0,1. A la mezcla de reacción se añadió una alícuota de peróxido de hidrógeno al 30% para producir una concentración de reacción de 1% de peróxido de hidrógeno.

25 El transcurso de la reacción se monitorizó siguiendo el cambio en el tamaño molecular del polisacárido a lo largo del tiempo. Cada 15 a 20 minutos, se extrajeron alícuotas de la mezcla de reacción y se inyectaron en una columna de HPSEC para medir el tamaño molecular del polisacárido. Cuando el tamaño molecular del polisacárido alcanzó el tamaño molecular buscado, se apagó la unidad de calentamiento y la disolución de polisacárido se enfrió rápidamente hasta 5°C mediante circulación a través de un baño de agua con hielo. La disolución de polisacárido despolimerizado se concentró hasta 15 g por litro conectando el tanque de reacción a una unidad de ultrafiltración equipada con cartuchos de celulosa regenerada de 3000 MWCO. La disolución concentrada de polisacárido despolimerizado se diafiltró frente a 10 volúmenes de disolución salina fisiológica estéril (cloruro de sodio al 0,85%). El polisacárido despolimerizado se almacenó entre 1 y 5°C hasta la siguiente etapa del procedimiento.

35 El tamaño molecular del polisacárido despolimerizado se determinó haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía de filtración en gel vendida con el nombre comercial "Ultahydrogel™250", que se calibró usando patrones de peso molecular de dextrano, y mediante dispersión de la luz de láser de múltiples ángulos. La cantidad de polisacárido se determinó mediante el contenido de fósforo para el serogrupo A usando el método de Bartlett, G.R.J. (1959) *Journal of Biological Chemistry*, 234, p. 466-468, y mediante el contenido de ácido siálico para los serogrupos C, W135 e Y usando el método de Svennerholm, L. (1955) *Biochimica Biophysica Acta* 24, p. 604-611. El contenido de O-acetilo se determinó mediante el método de Hesterin, S. (1949) *Journal of Biological Chemistry* 180, p. 249. La actividad reductora se determinó mediante el método de Park, J.T. y Johnson, M.J. (1949) *Journal of Biological Chemistry* 181, p. 149-151. La integridad estructural del polisacárido despolimerizado se determinó mediante RMN ¹H y ¹³C de la proteína. La pureza del polisacárido despolimerizado se determinó midiendo el contenido de LAL (endotoxina) y el contenido de peróxido de hidrógeno residual.

45

Ejemplo 3

Derivatización del polisacárido despolimerizado de los serogrupos A, C, W-135, e Y de *Neisseria meningitidis*

50 Los materiales usados en esta preparación incluyen los serogrupos A, C, W-135, e Y del polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* despolimerizado con peróxido de hidrógeno (preparado según el Ejemplo 2), dihidrazida de ácido adípico, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) para el serogrupo A solamente, cianoborohidruro de sodio, ácido clorhídrico 1N estéril, hidróxido sódico 1N estéril, cloruro de sodio 1M estéril, y disolución salina fisiológica estéril (cloruro de sodio al 0,85%).

55

Cada polisacárido del serogrupo se derivatizó en una reacción separada. Un tanque de acero inoxidable se cargó con el polisacárido despolimerizado purificado, y se diluyó con disolución salina fisiológica al 0,85% estéril para lograr una concentración final de la reacción de 6 g de polisacárido por litro. A esta disolución se añadió una alícuota concentrada de dihidrazida de ácido adípico disuelta en disolución salina fisiológica al 0,85% estéril, a fin de lograr una concentración de la reacción de 1 g por litro. Para el serogrupo A solamente, se añadió EDCA como una alícuota concentrada disuelta en disolución salina fisiológica al 0,85% estéril, para lograr una concentración de reacción de 1 g por litro. El pH se ajustó hasta 5,0 ± 0,1, y este pH se mantuvo durante 2 horas usando ácido clorhídrico estéril 1N e hidróxido sódico estéril 1N a temperatura ambiente (15 a 30°C). Después de dos horas, se añadió a la mezcla de reacción una alícuota concentrada de cianoborohidruro de sodio, disuelto en disolución salina fisiológica al 0,8%, para lograr una concentración de reacción de 2 g por litro. La reacción se agitó a temperatura ambiente (15 a 30°C) durante 44 horas ± 4 horas mientras se mantenía el pH a 5,5 ± 0,5. Tras este período de

65

reacción, el pH se ajustó hasta $6,0 \pm 0,1$, y el polisacárido derivatizado se concentró hasta 12 g de polisacárido por litro conectando el tanque de reacción a una unidad de ultrafiltración equipada con cartuchos de celulosa regenerada de 3000 MWCO. El polisacárido derivatizado concentrado se diafiltró durante 30 volúmenes de cloruro de sodio 1M, seguido de 10 volúmenes de cloruro de sodio 0,15M. Este tanque se desconectó de la unidad de ultrafiltración y se almacenó entre 1 y 5°C durante 7 días. El tanque se volvió a conectar a una unidad de ultrafiltración equipada con cartuchos de celulosa regenerada de 3000 MWCO, y se diafiltró frente a 30 volúmenes de cloruro de sodio 1M, seguido de 10 volúmenes de cloruro de sodio 0,15M.

El tamaño molecular del polisacárido derivatizado, la cantidad de polisacárido, y el contenido de O-acetilo se midió mediante los mismos métodos usados en el polisacárido despolimerizado. El contenido de hidrazida se midió mediante el método de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico de Snyder, S.L. y Sobocinski, P.Z. (1975) *Analytical Biochemistry* 64, p. 282-288. La integridad estructural del polisacárido derivatizado se determinó mediante RMN ^1H y ^{13}C . La pureza del polisacárido derivatizado se determinó midiendo el nivel de hidrazida no unida, el contenido de LAL (endotoxina), y el contenido de cianoborohidruro residual.

Ejemplo 4

Preparación de proteína portadora

Preparación de proteína de toxoide diftérico bruta

Se reconstituyeron y se incubaron cultivos de siembra liofilizados durante 16 a 18 horas. Una alícuota del cultivo se transfirió a un matraz de 0,5 litros que contiene medio de crecimiento, y el matraz de cultivo se incubó entre 34,5 y 36,5°C en un agitador giratorio durante 7 a 9 horas. Una alícuota del matraz de cultivo se transfirió a un matraz de 4 litros que contiene medio de crecimiento, y el matraz de cultivo se incubó entre 34,5 y 36,5°C en un agitador giratorio durante 14 a 22 horas. Los cultivos procedentes del matraz de 4 litros se usaron para inocular un fermentador que contiene medio de crecimiento. El fermentador se incubó entre 34,5 y 36,5°C durante 70 a 144 horas. Los contenidos del fermentador se filtraron a través de filtros de profundidad en una vasija de recolección. Se añadió a la cosecha una alícuota de disolución de formaldehído al 37% para lograr una concentración de 0,2%. El pH se ajustó entre 7,4 y 7,6. La cosecha se filtró a través de un cartucho de filtro de 0,2 micrómetros en botellas estériles de 20 litros. Las botellas se incubaron entre 34,5 y 36,5°C durante 7 días. A cada botella de 20 litros se añadió una alícuota de disolución de formaldehído, 37%, para lograr una concentración de 0,4%. El pH de las mezclas se ajustó entre 7,4 y 7,6. Las botellas se incubaron entre 34,5 y 36,5°C durante 7 días en un agitador. A cada botella de 20 litros se añadió una alícuota de disolución de formaldehído, 37%, para lograr una concentración de 0,5%. El pH de las mezclas se ajustó entre 7,4 y 7,6. Las botellas se incubaron entre 34,5 y 36,5°C durante 8 semanas. El toxoide bruto se ensayó para determinar la destoxificación. Las botellas se almacenaron entre 1 y 5°C durante el período de ensayo.

Purificación de la proteína de toxoide diftérico bruta

El toxoide bruto se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y los contenidos de las botellas de 20 litros se combinaron en un tanque de purificación. El pH del toxoide se ajustó entre 7,2 y 7,4, y se añadió carbón al toxoide bruto y se mezcló durante 2 minutos. La mezcla de carbón con el toxoide se dejó reposar durante 1 hora, y después se filtró a través de un cartucho de filtro de profundidad en un segundo tanque de purificación. Se añadió al filtrado sulfato de amonio sólido para lograr 70% de saturación. El pH se ajustó entre 6,8 y 7,2, y la disolución se dejó reposar durante 16 horas. La proteína precipitada se recogió por filtración y se lavó con disolución de sulfato de amonio saturada al 70%, pH 7,0. El precipitado se disolvió en agua destilada estéril, y la disolución de proteína se filtró en una vasija de recolección de acero inoxidable. El pH se ajustó entre 6,8 y 7,2, y se añadió sulfato de amonio hasta 40% de saturación. El pH de la disolución se ajustó entre 7,0 y 7,2, y se dejó que la disolución reposara durante 16 horas. El precipitado se eliminó por filtración y se descartó. Se añadió sulfato de sodio al filtrado hasta 70% de saturación, y el pH se ajustó entre 7,0 y 7,2. La mezcla se dejó reposar durante 16 horas, y la proteína precipitada se recogió mediante filtración. El precipitado se disolvió en agua destilada estéril, se filtró para eliminar la proteína no disuelta, y se diafiltró frente a disolución salina fisiológica al 0,85%.

Concentración y filtración estéril de la proteína de toxoide diftérico purificada

La disolución proteica se concentró hasta 15 g por litro y se diafiltró frente a 10 volúmenes de disolución salina fisiológica al 0,85% usando un cartucho de filtro de celulosa regenerada de 10.000 MWCO. La disolución proteica concentrada se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de 0,2 micrómetros. La disolución proteica se almacenó entre 1 y 5°C hasta que se procesó en el conjugado.

La concentración proteica se determinó mediante el método de Lowry, O.H. *et al* (1951) *Journal of Biological Chemistry* 193, p. 265-275. La pureza de la proteína se midió mediante esterilidad, contenido de LAL (endotoxina), y contenido de formaldehído residual.

Ejemplo 5

Preparación de conjugados monovalentes de polisacárido de los serogrupos A, C, W-135, e Y de *Neisseria meningitidis* con la proteína de toxoide diftérico

Los materiales usados en esta preparación incluyen polisacárido derivatizado con ácido adípico procedente de los serogrupos A, C, W-135, e Y de *Neisseria meningitidis* (preparados según el Ejemplo 3), proteína de toxoide diftérico estéril (preparada según el Ejemplo 4), EDAC, sulfato de amonio, ácido clorhídrico 1N estéril, hidróxido sódico 1N estéril, y disolución salina fisiológica estéril (0,85%).

Se preparó un conjugado de polisacárido de los serogrupos mediante una reacción separada. Los cuatro conjugados se prepararon mediante el siguiente procedimiento. Se cargó un tanque de acero inoxidable con polisacárido purificado derivatizado con ácido adípico a una concentración de reacción de 700 a 1000 μ moles de hidrazida reactiva por litro, y con proteína de toxoide diftérico purificada a una concentración de reacción de 3,8 a 4,0 g de proteína por litro. Para diluir los materiales de partida hasta las concentraciones de reacción diana, se usó disolución salina fisiológica al 0,85%, y el pH se ajustó hasta $5,0 \pm 0,1$. Se añadió una alícuota de EDAC a la mezcla de polisacárido-proteína para lograr una concentración de reacción de 2,28 a 2,4 g por litro. El pH de la reacción se mantuvo a $5,0 \pm 0,1$ durante 2 horas entre 15 y 30°C. Después de dos horas, el pH se ajustó hasta $7,0 \pm 0,1$ usando hidróxido sódico 1N estéril, y la reacción se almacenó entre 1 y 5°C durante 16 a 20 horas.

La mezcla de reacción se dejó calentar entre 15 y 30°C, y la vasija de reacción se conectó a una unidad de ultrafiltración equipada con un cartucho de celulosa regenerada de 30.000 MWCO. Se añadió sulfato de amonio sólido hasta 60% de saturación (para los serogrupos A, W-135 e Y) y 50% de saturación (para el serogrupo C). La mezcla de reacción del conjugado se diafiltró frente a 20 volúmenes de disolución de sulfato de amonio saturada al 60% (para los serogrupos A, W-135 e Y) y disolución de sulfato de amonio saturada al 50% (para el serogrupo C), seguido de 20 volúmenes de disolución salina fisiológica, 0,85%. El conjugado diafiltrado se filtró en primer lugar a través de una cápsula de filtro que contiene un filtro de 1,2 micrómetros y un filtro de 0,45 micrómetros, y después a través de una segunda cápsula de filtro que contiene un filtro de 0,22 micrómetros.

La cantidad de polisacárido y el contenido de O-acetilo se midieron mediante los mismos métodos usados en el polisacárido despolimerizado y derivatizado. La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Lowry. El tamaño molecular del conjugado se determinó haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía de filtración en gel vendida con el nombre "TSK6000PW" que usó ADN como el marcador de volumen vacío, ATP como el marcador del volumen total, y tiroglobulina bovina como un marcador de referencia. Además, el tamaño molecular del conjugado eluido de la columna TSK6000PW se midió mediante dispersión de luz de láser de múltiples ángulos. El carácter antigénico del conjugado se midió uniéndolo a un anticuerpo específico del serogrupo anti-polisacárido usando el método de ELISA de sándwich doble. La pureza de los conjugados se determinó midiendo la cantidad de polisacárido no unido (no conjugado) mediante elución a través de una columna de cromatografía de interacción hidrófoba, midiendo la proteína no conjugada mediante electroforesis capilar, midiendo la esterilidad, el contenido de LAL (endotoxina), el contenido de EDAC residual, y el contenido de ion amonio residual.

Ejemplo 6

Formulación de una vacuna meningocócica polivalente de un conjugado de polisacárido A, C, W-135 e Y con toxoide diftérico

Los materiales usados en esta preparación incluyen conjugados del polisacárido de los serogrupos A, C, W-135 e Y con toxoide diftérico (preparados según el Ejemplo 5), disolución salina fisiológica tamponada con fosfato de sodio 100 mM estéril (cloruro de sodio al 0,85%).

Una alícuota de disolución salina fisiológica tamponada con fosfato de sodio 100-500 mM estéril se añadió a disolución salina fisiológica (0,85%) en un tanque de formación de masa de acero inoxidable para producir una concentración de vacuna final de fosfato de sodio 10 mM. Una alícuota de cada uno de dos a cuatro de los conjugados meningocócicos monovalentes estériles de polisacárido-toxoide diftérico se añadió al tanque formador de masa que contiene disolución salina fisiológica tamponada con fosfato de sodio estéril 10 mM, para producir una concentración final de 8 μ g de cada polisacárido de los serogrupos por mililitro de tampón. El conjugado tetravalente conjugado se mezcló y se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m en un segundo tanque formador de masa.

La cantidad de cada polisacárido de los serogrupos presente en la formulación polivalente se determinó mediante análisis del sacárido componente usando cromatografía de intercambio aniónico de pH elevado con detección amperométrica pulsada. La cantidad de proteína se midió mediante el método de Lowry. El pH de la vacuna se midió usando un electrodo de combinación conectado a un peachímetro. El carácter antigénico de la vacuna de conjugado polivalente se midió uniéndola a un anticuerpo específico del serogrupo anti-polisacárido usando un método de ELISA de sándwich doble. La inmunogenicidad de la vacuna del conjugado polivalente se midió mediante la capacidad de cada conjugado presente en la vacuna para provocar tanto una respuesta inmunitaria IgG anti-polisacárido primaria como de refuerzo en un modelo de animal. La pureza de la vacuna del conjugado polivalente

se determinó midiendo la cantidad de polisacárido no unido (no conjugado) usando una cromatografía de intercambio iónico de pH elevado con detección amperométrica pulsada, midiendo la esterilidad, el contenido de LAL (endotoxina), el contenido pirogénico y la seguridad general.

5 Ejemplo 7

Preparación de conjugado meningocócico polivalente de polisacárido con proteína de toxoide diftérico adyuvantado con hidróxido de aluminio

10 La preparación de conjugado se adsorbió a hidróxido de aluminio. Los materiales usados en esta preparación incluyen la preparación de conjugados de polisacárido de los serogrupos A, C, W-135 e Y con toxoide diftérico descrita en el Ejemplo 5, disolución salina fisiológica estéril (cloruro de sodio al 0,85%), e hidróxido de aluminio estéril en disolución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,85%).

15 Una alícuota de cada uno de los conjugados monovalentes estériles meningocócicos del polisacárido con toxoide diftérico se añadió al tanque de formación de masa que contiene disolución salina fisiológica para producir una concentración final de 8 µg de cada polisacárido de los serogrupos por mililitro de tampón. Una alícuota de hidróxido de aluminio estéril en disolución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,85%) se añadió a la vacuna de conjugado polivalente para lograr una concentración final de 0,44 mg de ion aluminio por mililitro de vacuna.

20

Ejemplo 8

Preparación de conjugado adyuvantado con fosfato de aluminio

25 Los materiales usados en esta preparación incluyen la preparación de conjugados de polisacárido de los serogrupos A, C, W-135 e Y con toxoide diftérico descrita en el Ejemplo 5, disolución salina fisiológica estéril (cloruro de sodio al 0,85%), y fosfato de aluminio estéril en disolución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,85%).

30 Una alícuota de cada uno de los conjugados meningocócicos monovalentes estériles de polisacárido-toxoide diftérico se añadió al tanque de formación de masa que contiene disolución salina fisiológica para producir una concentración final de 8 µg de cada polisacárido de los serogrupos por mililitro de tampón. Una alícuota de fosfato de aluminio estéril en disolución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,85%) se añadió a la vacuna de conjugado polivalente para lograr una concentración final de 0,44 mg de ion aluminio por mililitro de vacuna.

35 Ejemplo 9

Inmunogenicidad de la vacuna de conjugado tetravalente

40 La vacuna de conjugado tetravalente se estudió para determinar su capacidad para provocar una respuesta inmunitaria en pequeños animales de laboratorio antes de la evaluación en la clínica. Para estudiar la inmunogenicidad de las vacunas de los conjugados con relación a las vacunas de polisacáridos, se usaron ratones, ratas y conejos. Estos modelos de animales son útiles debido a que son capaces de distinguir la vacuna de los conjugados de la vacuna de polisacáridos correspondiente por su patrón de respuesta inmunitaria. La vacuna de conjugado provoca una respuesta inmunitaria de tipo dependiente de T en estos modelos, mientras que la vacuna de polisacárido provoca una respuesta inmunitaria de tipo independiente de T.

50 En estudios de inmunogenicidad del ratón, el conjugado se diluyó con disolución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,85%) para administrar entre una cuarta parte y una decimosexta parte de una dosis humana. A los ratones se les administró una o dos dosis de vacuna, ya sea de conjugado o de polisacárido, y se extrajeron muestras de sangre dos semanas después de la vacunación. Un grupo de ratones sirvió como un grupo de control no inmunizado. Los anticuerpos frente a cada uno de los polisacáridos de los serogrupos se midieron mediante un método de ELISA. Las muestras de suero se incubaron con exceso de cada polisacárido capsular que se unió a un pocillo de placa de microtitulación de ELISA. Para unir cada polisacárido de los subgrupos al pocillo de microtitulación se usó seroalbúmina humana metilada. Tras la incubación, el pocillo de microtitulación se lavó con tampón, y se añadió un conjugado de anticuerpo secundario-enzima al complejo de anticuerpo-polisacárido, que se une al anticuerpo anti-polisacárido meningocócico. La placa de microtitulación se lavó, y se añadió un sustrato químico al conjugado de anticuerpo anti-polisacárido meningocócico-anticuerpo secundario-enzima. La enzima hidroliza una porción del sustrato químico, que da como resultado la formación de color. La cantidad de formación de color es proporcional a la cantidad de conjugado de anticuerpo anti-polisacárido meningocócico-anticuerpo secundario-enzima que se une al pocillo de microtitulación. La potencia de la vacuna se determinó comparando los antisueros de referencia para cada serogrupo, que se mide en la misma placa de microtitulación, mediante un cálculo en línea paralelo usando un ajuste de cuatro parámetros. Los antisueros de referencia de los ratones se generaron en la misma raza de ratones que se inmunizaron individualmente con tres dosis de cada vacuna de conjugado de los serogrupos. A los antisueros de referencia de los ratones se les asignó títulos basándose en la inversa de dilución que produce una densidad óptica de 1,0.

65

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los títulos de IgG anti-polisacárido para cada serogrupo logrados en ratones Swiss-Webster que se vacunaron con dos dosis de la vacuna de conjugado tetravalente, tanto formulación líquida como de hidróxido de aluminio, o la vacuna de polisacárido tetravalente correspondiente. Los títulos de IgG se midieron en sueros reunidos procedentes de un conjunto de diez ratones. Para medir la respuesta inmunitaria a cada formulación de vacuna, se usaron dos conjuntos de 10 ratones. Ambos conjuntos se vacunaron en el día 1. En el día 15 (2 semanas después de la vacunación) se extrajeron muestras de sangre de un conjunto de 10 ratones, y el segundo conjunto de diez ratones se vacunó con una segunda dosis de vacuna en el día 15. Dos semanas más tarde en el día 29, se tomaron muestras de sangre del segundo conjunto de 10 ratones, y del grupo de control no inmunizado. Todos los anticuerpos se titularon al mismo tiempo, esto es, tanto en el día 15 como en el día 29 se evaluaron las muestras de sangre al mismo tiempo junto con los controles no inmunizados y los sueros de referencia de los ratones.

Tabla 1

Títulos de IgG anti-polisacárido en sueros reunidos de ratones Swiss-Webster vacunados con conjugado tetravalente o con polisacárido.									
Grupo de vacuna	Dosis μg ps	Anti-A men		Anti-C men		Anti-W135 men		Anti-Y men	
		D15	D29	D15	D29	D15	D29	D15	D29
Conjugado (sin adyuvante)	0,25	131	2640	250	1510	1350	6100	5660	4830
Conjugado (sin adyuvante)	0,50	171	6220	416	2050	849	26000	5980	112000
Conjugado (sin adyuvante)	1,0	249	4500	525	2740	1450	16600	11300	59100
Conjugado (Hid. Alum.)	0,25	2920	4500	1010	2980	2300	33700	11600	124000
Conjugado (Hid. Alum.)	0,50	5800	9550	2280	1010	4810	71900	26400	330000
Conjugado (Hid. Alum.)	1,0	6210	9350	2630	12800	7870	94000	32700	302000
Polisacárido (sin adyuvante)	1,0	136	173	184	205	612	608	4470	3910
No inmunizados	n.a.	-	110	-	145	-	623	-	777

La vacuna del conjugado tetravalente, tanto sin adyuvante como con adyuvante con hidróxido de aluminio, es capaz de provocar una fuerte respuesta inmunitaria IgG anti-polisacárido en este modelo de ratón. El adyuvante de hidróxido de aluminio sirve para mejorar tanto la respuesta primaria como de refuerzo frente a cada uno de los cuatro conjugados de los polisacáridos de los serogrupos. La vacuna de polisacárido tetravalente provoca una respuesta inmunitaria insignificante frente a los serogrupos A, C y W135 en este modelo de ratón con relación al control no inmunizado, mientras que el serogrupo Y provoca una respuesta inmunitaria respetable, pero no una respuesta de refuerzo. La vacuna de polisacárido tetravalente no provoca una respuesta de refuerzo a los cuatro polisacáridos de los serogrupos en este modelo. Este modelo puede diferenciar fácilmente entre la vacuna de polisacárido y la vacuna de conjugado tanto por la magnitud de la respuesta inmunitaria como por el patrón de respuesta de refuerzo frente a cada una de las vacunas de conjugados de serogrupos.

Se ha estudiado en clínica la forma sin adyuvante de la vacuna de conjugado tetravalente para determinar la seguridad de inmunogenicidad en adultos sanos jóvenes y en niños sanos jóvenes. En el estudio con adultos, los sujetos se vacunaron con una sola dosis de vacuna, formulada para contener 4 μg de cada uno de los cuatro conjugados, como polisacárido. Se tomaron muestras de sangre inmediatamente antes de la vacunación y 28 días después de la vacunación. Los anticuerpos frente a cada uno de los conjugados de los serogrupos se midieron mediante una medida de ELISA que cuantificó la cantidad de IgG anti-polisacárido. El método de ELISA es muy similar al método usado para medir la cantidad de anticuerpo IgG presente en sueros de ratón.

De forma breve, se incubaron muestras de suero en pocillos de microtitulación de ELISA que se revistieron con polisacárido meningocócico en exceso que se unió a la placa con seroalbúmina humana metilada. La cantidad de anticuerpo unido se determinó mediante una reacción con anticuerpo monoclonal específico anti-IgG humana de ratón marcado con peroxidasa. Una reacción subsiguiente que usa sustrato de peroxidasa genera un producto cromogénico que se midió espectrofotométricamente. La densidad óptica resultante del cromóforo se correlaciona con la cantidad de anticuerpo IgG en el suero que se une al polisacárido meningocócico en la placa de microtitulación. La cantidad de anticuerpo se calculó comparando un suero de referencia humano (CDC 1922) con un valor asignado usando un método de curva logística de 4 parámetros. Además, los anticuerpos se midieron en busca de su capacidad para lisar bacterias específicas de serogrupos. Las muestras de suero se inactivaron primeramente por calor para destruir el complemento. Las muestras de suero se diluyeron mediante diluciones de dos veces en una placa de microtitulación estéril de 96 pocillos. A las diluciones de suero se añadieron bacterias específicas de serogrupos junto con complemento de conejo recién nacido, y se dejó incubar. Después de un período de incubación, se añadió un medio de recubrimiento de agar a la mezcla de suero/complemento/bacterias. El recubrimiento de agar se dejó endurecer, y después se incubó toda la noche a 37°C con dióxido de carbono al 5%. Al siguiente día, se contaron las colonias bacterianas presentes en los pocillos. El título de punto final se determinó mediante la dilución de suero recíproca que produce más del 50% de muertes en comparación con la media de los pocillos de control con complemento.

En la Tabla 2 se presenta un resumen de las concentraciones medias de IgG anti-polisacárido para cada serogrupo

y el título medio del anticuerpo bactericida sérico (SBA) en sueros de adulto antes y después de la vacunación con la vacuna de conjugado tetravalente formulada a 4 µg de polisacárido por dosis. La respuesta inmunitaria frente a los cuatro conjugados de los serogrupos fue satisfactoria, esto es, comparable a la respuesta inmunitaria lograda por la vacuna de polisacárido autorizada en términos tanto de respuestas de anticuerpo IgG como de anticuerpo bactericida funcional. Se encontró que la vacuna es segura para este grupo de edad, y se encontró que el perfil de seguridad es similar al de la vacuna de polisacárido autorizada.

Tabla 2

GMC (concentración media de grupo) de IgG anti-polisacárido y GMTs (títulos medios de grupo) de anticuerpo bactericida de suero para adultos sanos jóvenes vacunados con una vacuna meningocócica de conjugado tetravalente formulada a 4 µg por dosis por polisacárido					
Respuesta inmunitaria	N _{pre} /N _{post}	GMC de IgG (µg/ml) [95% CI]		GMT de SBA [95%CI]	
		Pre	Post	Pre	Post
A	28/28	3,3 [2,3-4,8]	38,4 [22,2-66,4]	487 [231-1027]	6720 [4666-15428]
C	28/28	0,4 [0,2-0,71]	5,5 [3,0-10,1]	16,4 [7,1-37,7]	1560 [800-4042]
W-135	28/28	0,6 [0,3-1,0]	5,8 [2,9-11,7]	10,0 [5,9-16,9]	609 [250-1481]
Y	28/28	1,3 [0,7-2,5]	6,8 [3,2-14,6]	19,0 [18,0-41,2]	390 [143-1061]

En grupos de edad más joven, niños con menos de 2 años de edad, la respuesta inmunitaria frente a la vacuna de polisacárido es débil, y se ha estimado que la inmunidad decrece después de un año. A niños de 12 a 15 meses de edad se les administró una única dosis de vacuna de conjugado tetravalente formulada a 4 µg de cada polisacárido de los serogrupos por dosis, y se les administró una segunda dosis de vacuna de conjugado tetravalente dos meses después de la primera dosis. Se tomaron muestras de sangre antes de la primera y de la segunda vacunación, y un mes después de la segunda vacunación. Las respuestas de anticuerpos frente a los cuatro conjugados de los serogrupos se resumen en la Tabla 3. Para cada serogrupo, se observó una respuesta de refuerzo para anticuerpo IgG y para anticuerpo bactericida funcional, tras una segunda dosis de conjugado tetravalente. El nivel de anticuerpo IgG provocado por la vacuna de conjugado es comparable al provocado por el polisacárido autorizado para este grupo de edad; una respuesta después de 6 semanas de 3,64 µg/ml (2,96-4,49) de respuesta de anticuerpo IgG frente al polisacárido del serogrupo C. Sin embargo, el nivel de anticuerpo bactericida provocado por la vacuna de conjugado es mucho mayor que el provocado normalmente por la vacuna de polisacárido autorizada para este grupo de edad; un título de SBA después de 6 semanas de 7,2 (5,0-10,4). Se piensa que la razón de esta discordancia entre el anticuerpo IgG y el anticuerpo bactericida en las poblaciones más jóvenes resulta de que el polisacárido provoca una proporción elevada de anticuerpo de baja avidéz en las poblaciones más jóvenes. Contrariamente, parece que el conjugado provoca una proporción mucho mayor de anticuerpo de avidéz elevada. Se piensa que el anticuerpo de avidéz elevada es responsable de la actividad bactericida.

Tabla 3

GMC (concentración media de grupo) de IgG anti-polisacárido y GMTs (títulos medios de grupo) de anticuerpo bactericida de suero para infantes sanos (1 a 2 años de edad) vacunados con dos dosis de vacuna meningocócica de conjugado tetravalente formulada a 4 µg por dosis por polisacárido							
Respuesta inmunitaria por serogrupo	N ₁ /N ₂ /N ₃	GMC de IgG (µg/ml) [95% CI]			GMT de SBA [95% CI]		
		Pre-dosis1	Pre-dosis2	Post-dosis 2	Pre-dosis1	Pre-dosis2	Post-dosis 2
A	8/8/8	0,2 [0,1-0,4]	2,1 [0,9-4,8]	4,4 [2,1-9,1]	8,7 [1,4-55,1]	1328 [179-9871]	3158 [1857-5371]
C	8/8/8	0,2 [0,0-0,7]	1,0 [0,3-3,1]	1,5 [0,6-3,6]	6,7 [2,0-23,0]	117 [37,7-365]	304 [128-721]
W-135	8/8/8	0,1 [0,1-0,2]	0,6 [0,2-1,9]	1,5 [0,8-3,1]	6,2 [2,2-17,2]	22,6 [2,8-185]	430 [172-1076]
Y	8/8/8	0,3 [0,2-0,4]	1,2 [0,5-2,8]	4,5 [2,7-7,6]	5,7 [3,7-8,8]	98,7 [20,4-478]	304 [101-920]

Además de la capacidad de la vacuna de conjugado tetravalente de provocar una respuesta de anticuerpo funcional elevada en poblaciones más jóvenes en comparación con la vacuna de polisacárido autorizada, la vacuna de conjugado tetravalente es capaz de provocar una respuesta anamnésica, demostrando que la protección provocada por la vacuna de conjugado tetravalente de la presente invención es de larga duración. En el desarrollo de la vacuna de conjugado tetravalente, se llevaron a cabo en primer lugar estudios sobre una formulación de conjugado bivalente AC. La vacuna ofrece una cobertura más amplia que el conjugado monovalente C autorizado actual, pero no protege frente a la enfermedad provocada por los serogrupos W135 e Y.

Se llevó a cabo un estudio clínico con lactantes que comparó la respuesta inmunitaria frente a la vacuna de polisacárido bivalente AC frente a la vacuna del conjugado bivalente AC. En este estudio, se enroló un tercer grupo de lactantes para servir como grupo de control, y recibieron un conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo b. Los tres grupos de vacunas recibieron las mismas vacunas pediátricas. El grupo del conjugado bivalente AC recibió tres dosis de vacuna de conjugado (4 µg de polisacárido por dosis) a 6, 10 y 14 semanas de edad. El grupo de polisacárido bivalente AC recibió dos dosis de una vacuna de polisacárido bivalente AC (50 µg de polisacárido por dosis) a 10 y 14 semanas de edad. El grupo del conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo b recibió tres dosis de vacuna de conjugado a 6, 10 y 14 semanas de edad. Se tomaron muestras de sangre a las seis semanas, antes de la vacunación, y a las 18 semanas, 4 semanas después de la vacunación. Cuando los niños tuvieron 11 a 12 meses de edad, se tomaron muestras de sangre, y los niños que recibieron el conjugado bivalente AC o la vacuna de polisacárido bivalente AC recibieron una dosis de refuerzo de polisacárido AC. La razón para la dosis de refuerzo del polisacárido fue evaluar si los sujetos provocarían o no una respuesta anamnésica.

Los resultados de este estudio, tanto las respuestas inmunitarias primarias como de refuerzo con polisacárido, se presentan en la Tabla 4 para la respuesta de anticuerpo IgG, y en la Tabla 5 para la respuesta de anticuerpo SBA. La respuesta de anticuerpo IgG después de la serie primaria fue aproximadamente la misma tanto para la vacuna de polisacárido como de conjugado. Sin embargo, la respuesta de anticuerpo bactericida en los sujetos vacunados con conjugado fue mucho mayor que aquella para los sujetos vacunados con polisacárido. Como se observa con los pacientes de un año de edad, la vacunación de los lactantes con el polisacárido provoca muy poco anticuerpo bactericida funcional. El anticuerpo provocado por los lactantes frente a la vacuna de polisacárido es presumiblemente anticuerpo de baja avidéz, mientras que la vacuna de conjugado parece provocar anticuerpo de avidéz elevada, dando cuenta de ese modo del título mucho mayor de anticuerpo bactericida. El nivel elevado de anticuerpo funcional provocado por la dosis de refuerzo de la vacuna de polisacárido en los sujetos que habían recibido la vacuna de conjugado en la serie de vacunación primaria indica que estos sujetos han sido sensibilizados para una respuesta de anticuerpo dependiente de células T o de memoria. Los sujetos que recibieron la vacuna de polisacárido en la serie de vacunación primaria provocaron una respuesta modesta frente a la dosis de refuerzo con polisacárido, esto es, indicativa de una respuesta independiente de células T.

Tabla 4

GMC (concentración media de grupo) de IgG anti-polisacárido en infantes frente a serogrupos A y C antes y después tanto de la inmunización en serie primaria (6, 10 y 14 semanas de edad) como de la vacunación de recuerdo con polisacárido bivalente AC dado a los 11 a 12 meses de edad.						
Respuesta inmunitaria por grupo de vacuna	GMC de vacunación primaria [95% CI]			GMC de vacunación de recuerdo con PS [95%CI]		
	N	Pre	Post	N	Pre	Post
Serogrupo A:						
Conjugado AC	34	3,4 [2,2-5,4]	5,8 [4,3-8,0]	31	0,2 [0,1-0,3]	7,0 [4,0-12,0]
Polisacárido AC	35	3,0 [1,7-5,3]	5,5 [4,1-7,3]	30	0,9 [0,5-1,4]	3,1 [2,0-4,7]
Conjugado HIB	36	3,2 [2,2-4,5]	0,6 [0,4-0,8]	NA	NA	NA
Serogrupo C:						
Conjugado AC	31	1,6 [0,9-2,8]	2,8 [2,0-3,9]	31	0,1 [0,1-0,2]	8,1 [4,5-14,5]
Polisacárido AC	35	2,3 [1,4-3,9]	5,3 [3,8-7,4]	30	0,6 [0,3-1,0]	2,8 [1,7-4,7]
Conjugado HIB	36	2,0 [1,2-3,5]	0,5 [0,3-0,7]	NA	NA	NA

Tabla 5

GMC (concentración media de grupo) de SBA en infantes frente a serogrupos A y C antes y después tanto de la inmunización de serie primaria (6, 10 y 14 semanas de edad) como de la vacunación de recuerdo con polisacárido bivalente AC dado a los 11 a 12 meses de edad.						
Respuesta inmunitaria por grupo de vacuna	GMC de vacunación primaria [95% CI]			GMC de vacunación de recuerdo con PS [95%CI]		
	N	Pre	Post	N	Pre	Post
Serogrupo A:						
Conjugado AC	34	11,8 [7,2-19,3]	177 [101-312]	24	10,1 [5,6-18,0]	373 [162-853]
Polisacárido AC	32	14,7 [8,5-25,4]	7,0 [4,7-10,5]	26	6,1 [3,9-9,5]	24,1 [11-53]
Conjugado HIB	35	11,2 [6,8-18,3]	6,7 [4,3-10,5]	NA	NA	NA

Serogrupo C:						
Conjugado AC	34	50,8 [24-107]	189 [128-278]	27	4,6 [3,6-5,6]	287 [96,2-858]
Polisacárido AC	32	62,7 [29-131]	25,4 [14,4-44,6]	26	4,1 [3,9-4,3]	14,4 [7,9-26,1]
Conjugado HIB	36	45,3 [21,9-133]	7,3 [4,7-11,3]	NA	NA	NA

Además de los beneficios que esta invención ofrece de la protección mejorada frente a la enfermedad meningocócica en poblaciones jóvenes y la protección más amplia frente a serogrupos A, C, W-135 e Y, el conjugado tetravalente puede proporcionar protección frente a otros patógenos induciendo una respuesta de anticuerpo frente a la proteína portadora. Cuando la vacuna de conjugado tetravalente, que usa conjugado con toxoide diftérico, se administró a lactantes, estos sujetos también recibieron las inmunizaciones pediátricas habituales, que incluyeron el toxoide diftérico. Por lo tanto, en estos sujetos no hubo ninguna mejora aparente en la respuesta de anticuerpo frente al toxoide diftérico. Sin embargo, cuando se administró el conjugado del toxoide diftérico a sujetos que no recibieron vacunas concomitantes que contienen toxoide diftérico, se observó una fuerte respuesta de refuerzo frente al toxoide diftérico. Estos sujetos habían recibido un régimen de tres dosis de DTP a los 2, 3 y 4 meses de edad. En este estudio, los sujetos recibieron una única dosis de un conjugado bivalente AC o una única dosis de una vacuna de polisacárido bivalente AC entre 2 y 3 años de edad. Se tomaron muestras de sangre en el momento de la vacunación y 30 días después de la vacunación. El conjugado bivalente AC usó el toxoide diftérico como la proteína portadora.

En la Tabla 6 se presenta la respuesta inmunitaria del toxoide diftérico en los dos grupos de vacunas. El polisacárido no sirve para estimular una respuesta inmunitaria anti-difteria en estos sujetos como se esperaba; sin embargo, se observó una fuerte respuesta inmunitaria anti-difteria para los sujetos que recibieron el conjugado AC. Por lo tanto, la vacuna de conjugado meningocócica puede proporcionar un beneficio añadido de estimulación de una respuesta inmunitaria frente a proteína portadora, proporcionando de ese modo protección frente a enfermedades provocadas por *Corynebacteria diphtheriae* cuando se usa el toxoide diftérico como proteína portadora.

Tabla 6

GMT (título medio de grupo) de anticuerpo anti-difteria mediante ELISA en UI/ml en niños sanos jóvenes vacunados con una vacuna bivalente de conjugado AC con toxoide diftérico formulada a 4µg como polisacárido por dosis o una vacuna bivalente de polisacárido AC formulada a 50 µg como polisacárido por dosis			
Respuesta inmunitaria por grupo de vacuna	N _{pre} /N _{post}	Anticuerpo anti-difteria (ELISA - UI/ml) [95%CI]	
		Pre	Post
Conjugado AC	104/103	0,047 [0,036-0,060]	21,2 [11,6-38,6]
Polisacárido AC	103/102	0,059 [0,045-0,076]	0,059 [0,045-0,077]

- Referencias:**
- Frasch, C.E., Zollinger, W.D. y Poolman, J.T. (1985) Review of Infectious Diseases 7, p. 504-510.
- Reido, F.X., Plikaytis, B.D. y Broome, C. V. (1995) Pediatric Infectious Disease Journal 14, p.643-657.
- Artenstein, M.S., Gold, R., Zimmerly, J.G., Wyle, F.A., Schneider, H. y Harkins, C. (1970) The New England Journal of Medicine 282, p. 417-420.
- Peltola, H., Makela, H., Kayhty, H., Jousimies, H., Herva, E., Hallstrom, K., Sivonen, A., Renkonen, O.V., Pettay, O., Karanko, V., Ahvonen, P., y Sarna, S. (1997) The New England Journal of Medicine 297, p. 686-691.
- Reingold, A.L., Broome, C.V., Hightower, A.W., Ajello, G.W., Bolan, G.A., Adamsbaum, C., Jones, E.E., Phillips, C., Tiendrebeogo, H., y Yada, A. (1985) The Lancet 2, p. 114-118.
- Goldschneider, I., Lepow, M.L., Gotschlich, E.C., Mauck, F.T., Bachl, F., y Randolph, M. (1973) The Journal of Infectious Diseases 128, p. 769-776.
- Gold, R., Lepow, M.L., Goldschneider, I., y Gotschlich, E.C. (1977) The Journal of Infectious Diseases 136, S31-S35.
- Brandt, B.L. y Artenstein, M.S. (1975) The Journal of Infectious Diseases 131, p. S69-S72.
- Kayhty, H., Karanko, V., Peltola, H., Sarna, S, y Makela, H. (1980) The Journal of Infectious Diseases 142, p. 861-868.

Cessey, S.J., Allen, S.J., Menon, A., Todd, J.E., Cham, K., Carlone, G.M., Turner, S.H., Gheesling, L.L., DeWitt, W., Plikaytis, B.D., y Greenwood, B. (1993) *The Journal of Infectious Diseases* 167, p. 1212-1216.

5 Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, G.L., Tramont, E.C., Kasper, D.L., Altieri, P.L., Berman, S.L., y Lo-wenthal, J.P. (1972) *The Journal of Infectious Diseases*, 126, p. 514-522.

Jennings, H.J. and Lugowski, C. (1981) *The Journal of Immunology* 127, p. 1011-1018.

Párrafos de la invención

- 10
1. Composición inmunológica que comprende dos, tres o cuatro conjugados de proteína polisacáridos distintos, en la que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de dos o más serogrupos de *N. meningitidis* conjugado a una o más proteínas portadoras.
- 15
2. Composición inmunológica según el párrafo 1, en la que los polisacáridos capsulares son seleccionados de entre el grupo que consiste en polisacáridos capsulares a partir de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*.
3. Composición inmunológica según el párrafo 1, en la que los polisacáridos capsulares proceden de los serogrupos A y C de *N. meningitidis*.
- 20
4. Composición inmunológica según el párrafo 1, en la que los polisacáridos capsulares proceden de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*.
5. Composición inmunológica según el párrafo 1, en la que la proteína portadora es el toxoide diftérico.
- 25
6. Composición inmunológica según el párrafo 1, que comprende además un adyuvante.
7. Composición inmunológica según el párrafo 5, en la que el adyuvante es el hidróxido de aluminio.
- 30
8. Composición inmunológica según el párrafo 5, en la que el adyuvante es el fosfato de aluminio.
9. Método para inducir una respuesta inmunitaria a un polisacárido capsular de *N. meningitidis* que comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunológica según el párrafo 1 a un ser humano o a un animal.
- 35
10. Vacuna meningocócica polivalente que comprende unas cantidades inmunológicamente eficaces a partir de dos a cuatro conjugados de proteína-polisacárido distintos, en la que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y en la que cada polisacárido capsular es seleccionado de entre el grupo que consiste en polisacárido capsular de entre los serogrupos A, C, W-135 e Y.
- 40
11. Vacuna meningocócica polivalente según el párrafo 9, en la que los polisacáridos capsulares son preparados a partir de los serogrupos A y C de *N. meningitidis*.
- 45
12. Vacuna meningocócica polivalente según el párrafo 9, en la que los polisacáridos capsulares son preparados a partir de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*.
13. Vacuna meningocócica polivalente según el párrafo 9, en la que la proteína portadora es el toxoide diftérico.
- 50
14. Vacuna meningocócica polivalente según el párrafo 9, que comprende además un adyuvante.
15. Vacuna meningocócica polivalente según el párrafo 13, en la que el adyuvante es el hidróxido de aluminio.
16. Vacuna meningocócica polivalente según el párrafo 13, en la que el adyuvante es el fosfato de aluminio.
- 55
17. Método de protección de un ser humano o un animal sensible a infección a partir de *N. meningitidis* que comprende administrar al ser humano o al animal una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna según el párrafo 9.

REIVINDICACIONES

1. Vacuna meningocócica polivalente que comprende cantidades inmunológicamente eficaces de tres o cuatro conjugados distintos de proteína-polisacárido para su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis*, en la que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y en la que cada polisacárido capsular es seleccionado de entre el grupo que consiste en polisacáridos capsulares a partir de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*, en la que además:
- 5 (i) la proteína portadora es CRM197; y
- (ii) cuando hay cuatro conjugados de proteína-polisacárido distintos, cada uno de dichos polisacáridos está despolimerizado parcialmente.
- 15 2. Vacuna para su utilización según la reivindicación 1, en la que existen tres conjugados proteína-polisacárido distintos y cada uno de dichos polisacáridos está parcialmente despolimerizado.
3. Vacuna para su utilización según la reivindicación 1, en la que la vacuna comprende cuatro conjugados proteína-polisacárido distintos y en la que dichos polisacáridos capsulares comprenden los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. Meningitidis*.
- 20 4. Vacuna para su utilización según las reivindicaciones 1 a 3, en la que la vacuna comprende además un adyuvante.
- 25 5. Vacuna para su utilización según la reivindicación 4, en la que el adyuvante es hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.
6. Vacuna para su utilización según las reivindicaciones 1 a 3, en la que la vacuna no contiene un adyuvante.
- 30 7. Vacuna para su utilización según las reivindicaciones 1 a 6, en la que la vacuna incluye una preparación líquida.
8. Vacuna para su utilización según las reivindicaciones 1 a 7, en la que la vacuna incluye una composición liofilizada.
- 35 9. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis*, caracterizado por que son utilizados tres o cuatro conjugados proteína-polisacárido distintos, comprendiendo dicho método preparar por separado los conjugados y combinar a continuación los conjugados en una composición inmunológica, en el que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora y en el que cada polisacárido capsular es
- 40 seleccionado de entre el grupo que consiste en polisacáridos capsulares a partir de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*, en el que además:
- (i) la proteína portadora es CRM197; y
- 45 (ii) cuando hay cuatro conjugados proteína-polisacárido distintos, dicho método comprende la despolimerización parcial de los polisacáridos antes de la conjugación.
10. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según la reivindicación 9, en el que la vacuna comprende cuatro conjugados proteína-polisacárido distintos y en el que dichos polisacáridos capsulares comprenden los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis*.
- 50 11. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según la reivindicación 9, en el que son utilizados tres conjugados proteína-polisacárido distintos y dicho método comprende además la despolimerización parcial de los polisacáridos antes de la conjugación.
- 55 12. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según las reivindicaciones 9 a 11, en el que, tras dicha despolimerización, los polisacáridos son activados mediante un tratamiento químico para proporcionar unos grupos químicos capaces de reaccionar con la proteína portadora.
- 60 13. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según las reivindicaciones 9 a 12, en el que la vacuna comprende además un adyuvante.
- 65

14. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según la reivindicación 13, en el que el adyuvante es hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.
- 5 15. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según las reivindicaciones 9 a 12, en el que la vacuna no contiene un adyuvante.
- 10 16. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección de un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según las reivindicaciones 9 a 15, en el que la vacuna incluye una preparación líquida.
- 15 17. Método para fabricar una vacuna meningocócica polivalente destinada a su utilización en la protección en un ser humano contra la infección por *N. meningitidis* según las reivindicaciones 9 a 16, en el que la vacuna incluye una composición liofilizada.