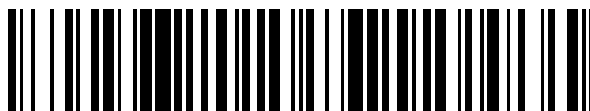


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 366**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2008 E 08761319 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2167121**

54 Título: **Vacuna que comprende conjugados de polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae**

30 Prioridad:

26.06.2007 GB 0712435

26.06.2007 GB 0712420

26.06.2007 GB 0712428

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2015

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)

RUE DE L'INSTITUT, 89

1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:

BIEMANS, RALPH LEON;

HERMAND, PHILIPPE VINCENT y

POOLMAN, JAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 552 366 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 que comprende conjugados de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*

Campo de la invención

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

5 Antecedentes de la invención

Los niños de menos de 2 años de edad no presentan una respuesta inmunitaria a la mayoría de vacunas de polisacárido, de modo que ha sido necesario volver los polisacáridos inmunogénicos mediante conjugación química a una proteína vehículo. El acoplamiento del polisacárido, un antígeno independiente de T, a una proteína, un antígeno dependiente de T, confiere al polisacárido las propiedades de dependencia de T que incluyen cambio de isotipo, maduración en afinidad, e inducción de memoria. El documento de patente WO03/051392 desvela una vacuna de conjugado de *Streptococcus pneumoniae*.

Sin embargo, puede haber problemas con la administración repetida de conjugados de polisacárido-proteína, o la combinación de conjugados de polisacárido-proteína para formar vacunas multivalentes. Por ejemplo, se ha informado que una vacuna de polisacárido de *Haemophilus influenzae* de tipo b (PRP) que usa toxoide del tétanos (TT) como proteína vehículo se sometió a ensayo en un intervalo de dosificación con inmunización simultánea con TT (libre) y una vacuna de conjugado de polisacárido-TT de neumococos seguido del programa convencional del niño. A medida que aumentó la dosificación de la vacuna de neumococos, disminuyó las respuestas inmunitarias a la parte del polisacárido PRP de la vacuna de conjugado Hib, lo que indica interferencia inmunitaria del polisacárido, posiblemente a través del uso de la misma proteína vehículo (Dagan y col., Infect Immun. (1998); 66: 2093-2098).

El efecto de la dosificación de la proteína vehículo en la respuesta humoral a la propia proteína también ha probado ser polifacético. En niños humanos, se ha informado que el aumento de la dosificación de un conjugado de toxoide del tétanos tetravalente dio como resultado una disminución de la respuesta al vehículo del tétanos (Dagan y col., citado anteriormente). El análisis clásico de estos efectos de vacunas de combinación se ha descrito como supresión de epítipo inducida por vehículo, que no se comprende completamente, pero se cree que resulta de un exceso de cantidad de proteína vehículo (Fattom, Vaccine 17: 126 (1999)). Esto parece dar como resultado la competición por las células Th, mediante los linfocitos B respecto a la proteína vehículo, y los linfocitos B respecto al polisacárido. Si los linfocitos B respecto a la proteína vehículo predominan, no hay suficientes células Th disponibles para proporcionar la ayuda necesaria para los linfocitos B específicos respecto al polisacárido. Sin embargo, los efectos inmunológicos observados han sido inconsistentes, aumentando las respuestas inmunitarias la cantidad total de proteína vehículo en algunos casos, y en otros casos disminuyendo las respuestas inmunitarias.

Por lo tanto, aún quedan dificultades técnicas en la combinación de múltiples conjugados de polisacárido en una formulación de vacuna sencilla y eficaz.

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram positiva responsable de una considerable morbilidad y mortalidad (particularmente en individuos jóvenes y de edad avanzada), que causa enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteremia, y meningitis, y enfermedades asociadas a colonización, tales como otitis media aguda. Se estima que la tasa de neumonía por neumococos en los Estados Unidos para personas de más de 60 años de edad es de 3 a 8 por cada 100.000. En un 20 % de los casos esto conduce a bacteremia, y otras manifestaciones tales como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana a un 30 % incluso con tratamiento de antibióticos.

Los neumococos se encapsulan con un polisacárido unido químicamente que confiere especificidad de serotipo. Existen 90 serotipos conocidos de neumococos, y la cápsula es el determinante de virulencia principal para los neumococos, ya que la cápsula no solo protege la superficie interior de la bacteria del complemento, sino que es poco inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos independientes de T, y no se pueden procesar o presentar sobre moléculas de MHC para interactuar con linfocitos T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmunitario a través de un mecanismo alternativo que implica entrecruzamiento de receptores superficiales en linfocitos B.

En varios experimentos se mostró que la protección frente a enfermedad invasiva por neumococos se correlaciona en gran medida con anticuerpo específico para la cápsula, y la protección es específica del serotipo.

Streptococcus pneumoniae es la causa más habitual de enfermedad bacteriana invasiva y Otitis media en bebés y niños pequeños. De forma análoga, las personas mayores presentan escasas respuestas a vacunas de neumococos [Roghmann y col., (1987), J. Gerontol. 42: 265-270], de ahí el aumento de incidencia de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62: 271-285].

Los síndromes clínicos principales causados por *S. pneumoniae* se reconocen ampliamente y se analizan en todos los libros de texto médicos convencionales (Fedson DS, Muscher DM. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4ª edición. Philadelphia WB Saunders Co, 2004a: 529-588). Por ejemplo, la enfermedad por neumococos invasiva (IPD) se define como cualquier infección en la que *S. pneumoniae* se aísla de la sangre u otro sitio normalmente estéril (Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles

and Practice of Infectious diseases (5ª ed). Nueva York, Churchill Livingstone, 2001, p2128-2147). Se reconoce que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) incluye varias afecciones (construcción del flujo de aire, bronquitis crónica, bronquiolitis o enfermedad de las vías respiratorias menores y enfisema) que a menudo coexisten. Algunos pacientes padecen exacerbación de su afección que normalmente están asociados con aumento de disnea, y a menudo presentan aumentos de la tos que puede producir moco o esputo purulento (Wilson, Eur Respir J 2001 17:995-1007). La EPOC se define fisiológicamente por la presencia de promoción de las vías respiratorias irreversible o parcialmente reversible en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. Noviembre de 1995; 152 (5 Pt 2): S77-121). El exacerbación de la EPOC a menudo están causados por infección por bacterias (por ejemplo, neumococos) (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. Abril de 2001; 14 (2): 336-63).

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es desarrollar una formulación mejorada de una vacuna de conjugado de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* de serotipo múltiple.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus de edad más avanzada (niveles de IgG anti-PS post-II) Diagrama de barras que muestra la inmunogenicidad del conjugado 11 valente en monos Rhesus de edad más avanzada. Las barras de color más claro representan la GMC después de dos inoculaciones con conjugados 11 valente en adyuvante de fosfato de aluminio. Las barras de color más oscuro representan la GMC después de dos inoculaciones con conjugado 11 valente en adyuvante C.

Figura 2 Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus de edad más avanzada (frecuencias de linfocitos B de memoria anti-PS3 post-II) Diagrama de barras que muestra linfocitos B de memoria para PS3 después de inoculación con el conjugado 11 valente en adyuvante C o adyuvante de fosfato de aluminio.

Figura 3 Inmunogenicidad de PS19F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III) Diagrama de barras que muestra inmunogenicidad de 19F anti polisacárido en ratones Balb/C para los polisacáridos sencillos 4-valente y los conjugados de dPly 4-valente.

Figura 4 Inmunogenicidad de PS22F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III) Diagrama de barras que muestra inmunogenicidad de 22F anti polisacárido en ratones Balb/C para los polisacáridos sencillos 4-valente y los conjugados de PhtD 4-valente.

Figura 5 Niveles de anticuerpo de IgG anti-PS en suero Diagrama de barras que muestra respuesta a IgG anti-22F en ratones Balb/c.

Figura 6 Titulaciones de opsonofagocitosis anti-22F en ratones Balb/c Diagrama de barras que muestra titulaciones de opsonofagocitosis anti-22F en ratones Balb/c.

Figura 7 Comparación de respuestas de IgG inducidas en inmunizaciones post III en ratones C57Bl jóvenes con nuevos adyuvantes o AIPO4 Diagrama de barras que compara respuestas de IgG inducidas en ratones C57Bl jóvenes después de inmunización con vacuna de conjugado 13 Valente formulará en diferentes adyuvantes. Las barras están en el mismo orden indicado en la columna al lado derecho.

Figura 8 Eficacia protectora de la combinación de proteínas PhtD y dPly frente a colonización pulmonar de tipo 19F en monos Rhesus Diagrama de barras que muestra la eficacia protectora de diferentes combinaciones de vacuna en un modelo de neumonía de mono. La categoría "muerto" incluye monos que habrían muerto si no hubiera sido por la administración del tratamiento con antibiótico.

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

Figura 10 Protección frente a exposición inmunitaria con neumococos de tipo 4 en ratones Protección frente a la exposición inmunitaria con neumococos de tipo 4 en ratones después de inmunización con 22F-PhtD o 22FAH-PhtD.

Figura 11 Protección frente a la exposición inmunitaria letal con la cepa de 3/43 *S. pneumoniae* después de inmunización con PhtD e inmunización pasiva con anticuerpos frente a polisacárido de serotipo 3.

Figura 12 Protección frente a la exposición inmunitaria letal con la cepa 1/57 de *S. pneumoniae* después de inmunización con PhtD e inmunización pasiva con anticuerpos frente a polisacárido de serotipo 1.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* mejor que comprende 12, o más sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con 2 o más proteínas vehículo, en la que la vacuna comprende sacárido capsular de serotipo 19F conjugado con toxoide de difteria o CRM197, y 2-8

sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* seleccionados entre diferentes serotipos conjugados con proteína D y en la que una mitad o una minoría de los conjugados de sacárido capsular contienen proteína D como proteína vehículo.

Para los fines de la presente invención, "inmunización de un hospedador humano frente a exacerbaciones de EPOC" o "tratamiento o prevención de exacerbaciones de EPOC" o "reducción de la gravedad de de exacerbaciones de EPOC" se refiere a una reducción de la incidencia o tasa de exacerbaciones de EPOC (por ejemplo, una reducción de la tasa de un 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 % o más) o una reducción en la gravedad de de exacerbaciones de EPOC como se ha definido anteriormente, por ejemplo dentro de un grupo de pacientes inmunizados con las composiciones o vacunas de la invención.

Por lo general, la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá antígenos de sacárido capsular (preferentemente conjugados), en la que los sacáridos se derivan de al menos diez serotipos de *S. pneumoniae*. El número de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar de 10 serotipos diferentes (o "v", valencias) a 23 serotipos diferentes (23v). En una realización hay 10, 11, 12, 13, 14 o 15 serotipos diferentes. En otra realización de la invención, la vacuna puede comprender sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados y sacáridos de *S. pneumoniae* sin conjugar. Preferentemente, el número total de serotipos de sacárido es inferior o igual a 23. Por ejemplo, la invención puede comprender 10 serotipos conjugados y 13 sacáridos sin conjugar. De una manera similar, la vacuna puede comprender 11, 12, 13, 14, 15 o 16 sacáridos conjugados y 12, 11, 10, 9, 8 o 7, respectivamente, sacáridos sin conjugar.

La expresión "seleccionados entre diferentes serotipos" se refiere a que los sacáridos capsulares conjugados con proteína D son de serotipos de *S. pneumoniae* distintos de 19F.

La composición inmunogénica de la invención contiene 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 3-5, 4-5, 2-4, 2-3, 3-4 o 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 conjugados de sacárido capsular en los que la proteína D es la proteína vehículo. Por ejemplo, el sacárido del serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F o 23F se conjuga con la proteína D. Por ejemplo, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 3-5, 4-5, 2-4, 2-3, 3-4 o 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 sacáridos seleccionados entre el serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F se conjugan con la proteína D.

En una realización, los sacáridos de al menos los serotipos 1 y 3, 1 y 4, 1 y 5, 1 y 6A, 1 y 6B, 1 y 7, 1 y 9V, 1 y 14, 1 y 22F, 1 y 23F, 3 y 4, 3 y 5, 3 y 6A, 3 y 6B, 3 y 7F, 3 y 9V, 3 y 14, 3 y 22F, 3 y 23F, 4 y 5, 4 y 6A, 4 y 6B, 4 y 7F, 4 y 9V, 4 y 14, 4 y 22F, 4 y 23F, 5 y 6A, 5 y 6B, 5 y 7F, 5 y 9V, 5 y 14, 5 y 22F, 5 y 23F, 6A y 6B, 6A y 7F, 6A y 9V, 6A y 14, 6A y 22F, 6A y 23F, 6B y 7F, 6B y 9V, 6B y 14, 6B y 22F, 6B y 23F, 7F y 9V, 7F y 14, 7F y 22F, 7F y 23F, 9V y 14, 9V y 22F, 9V y 23F, 14 y 22F, 14 y 23F o 22F y 23F se conjugan con la proteína D.

En una realización, los sacáridos de al menos los serotipos 1, 3 y 4; 1, 3 y 5; 1, 3 y 6A; 1, 3 y 6B; 1, 3 y 7F; 1,3 y 9V; 1, 3 y 14; 3, 4 y 7F; 3, 4 y 5; 3, 4 y 7F; 3, 4 y 9V; 3, 4 y 14; 4, 5 y 7F; 4, 5 y 9V; 4, 5, y 14; 5, 7F y 9V; 5, 7F y 14; 7F, 9V y 14; 1, 3, 4 y 5; 3, 4, 5 y 7F; 4, 5, 7F y 9V; 4, 5, 7F y 14; 4, 5, 9V y 14; 4, 7F, 9V y 14; 5, 7F, 9V y 14; o 4, 5, 7F, 9V y 14 se conjugan con la proteína D.

La mitad o una minoría de los conjugados de sacárido capsular presentes en la composición inmunogénica de la invención contienen proteína D como proteína vehículo. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 10 valente, 2, 3, 4 o 5 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 11 valente, 2, 3, 4 o 5 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 12 valente, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 13 valente, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 14 valente, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 15 valente, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 16 valente, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 17 valente, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 18 valente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* 19 valente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con la proteína D. Opcionalmente, los serotipos conjugados con la proteína D se seleccionan entre los grupos que se han descrito anteriormente.

En una realización, la vacuna de neumococos polivalente de la invención se seleccionará entre los siguientes serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, aunque se observa que uno u otros dos serotipos se podrían sustituir dependiendo de la edad del receptor que recibe la vacuna y la situación geográfica en la que se administrará la vacuna, por ejemplo el serotipo 6A se puede incluir en la lista. Por ejemplo, una vacuna 10-valente puede comprender polisacáridos de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una vacuna 11-valente también puede incluir sacáridos del serotipo 3. Una vacuna pediátrica (infantil) 12 o 13-valente también puede incluir la formulación 10 o 11 valente complementada con los serotipos 6A y 19A, o 6A y 22F, o 19A y 22F, o 6A y 15, o 19A y 15, o 22F y 15, entras que una vacuna para adultos 13-valente puede incluir la formulación 11 valente complementada con los serotipos 19A y 22F, 8 y 12F, o 8 y 15, o 8 y 19A, o 8 y 22F, o 12F y 15, o 12F y 19A, o 12F y 22F, o 15 y 19A, o 15 y 22F. Una vacuna pediátrica 14 valente puede incluir

la formulación 10 valente que se ha descrito anteriormente complementada con los serotipos 3, 6A, 19A y 22F; serotipos 6A, 8, 19A y 22F; serotipos 6A, 12F, 19A y 22F; serotipos 6A, 15, 19A y 22F; serotipos 3, 8, 19A y 22F; serotipos 3, 12F, 19A y 22F; serotipos 3, 15, 19A y 22F; serotipos 3, 6A, 8 y 22F; serotipos 3, 6A, 12F y 22F; o serotipos 3, 6A, 15 y 22F.

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

La composición inmunogénica de la presente invención comprende proteína D (PD) de *Haemophilus influenzae* (véase, por ejemplo, la Fig 9 del documento de patente EP 0594610). *Haemophilus influenzae* es un organismo causal fundamental de la otitis media, y los presentes inventores han mostrado que la inclusión de esta proteína en una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* proporcionará un nivel de protección frente a la otitis media relacionada con *Haemophilus influenzae* (Pirmula y col., Lancet 367: 740-748 (2006)). En un aspecto, la PD está presente como una proteína vehículo para uno o más de los sacáridos. En otro aspecto, la proteína D podría estar presente en la composición de vacuna como una proteína libre. En un aspecto adicional, la proteína D está presente tanto como una proteína vehículo como una proteína libre. La proteína D se puede usar como una proteína de longitud completa o como un fragmento (documento de patente WO0056360). En un aspecto adicional, la proteína D está presente como una proteína vehículo para la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los sacáridos se pueden conjugar con la proteína D. En este aspecto, la proteína D también puede estar presente como proteína libre.

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

Cada sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* se puede conjugar con una proteína vehículo seleccionada independientemente entre el grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de fusiones de TT, PhtD, PhtDE (en particular las que se describen en el documento de patente WO 01/98334 y dos de 03/54007), neumolisina detoxificada y proteína D, distintos de sacárido del serotipo 19F que siempre se conjuga con DT o CRM 197, preferentemente con DT. Un listado más completo de proteínas vehículo que se pueden usar en los conjugados de la invención se presenta a continuación.

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

La proteína vehículo conjugada a uno o más de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* en los conjugados presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención es opcionalmente un miembro de las proteínas de la familia de la tríada de polihistidina (Pht), fragmentos o proteínas de fusión de las mismas. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o un 100 % con una secuencia desvelada el documento de patente WO 00/37105 o en el documento de patente WO 00/39299 (por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos 1-838 o 21-838 de la SEC ID N°: 4 del documento de patente WO 00/37105 para PhtD). Por ejemplo, las proteínas de fusión están formadas por la longitud completa o fragmentos de 2, 3 o 4 de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Algunos ejemplos de proteínas de fusión son PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B y PhtE/D, en las que las proteínas se unen con la mencionada primero en el extremo N-terminal (véase, por ejemplo, el documento de patente WO01/98334).

Cuando se usan fragmentos de proteínas Pht (por separado o como parte de una proteína de fusión), cada fragmento contiene opcionalmente uno o más motivos de tríada de histidina, y/o regiones de bucles superenrollados de tales polipéptidos. Un motivo de tríada de histidina es la parte de polipéptido que tiene la secuencia HxxHxH en la que H es histidina y x es un aminoácido distinto de histidina. Una región de bucles superenrollados es una región predicha por el algoritmo "Coils" de Lupus, A y col., (1991) Science 252: 1162-1164. En una realización el o cada fragmento incluye uno o más motivos de tríada de histidina así como al menos una región de bucles superenrollados. En una realización, el o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3, 4 o 5 motivos de

tríada de histidina (opcionalmente, con secuencia Pht nativa entre las 2 o más tríadas, o una secuencia intratríada que es más de un 50, 60, 70, 80, 90 o un 100 % idéntica a una secuencia PhtD intratríada de neumococos nativa - por ejemplo, la secuencia intratríada mostrada en SEC ID N°: 4 del documento de patente WO 00/37105 para PhtD). En una realización, el o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3, o 4 regiones de bucles superenrollados. En una realización una proteína PhtD desvelada en el presente documento incluye la proteína de longitud completa con la secuencia de señal unida, la proteína de longitud completa madura con el péptido de señal retirado (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N-terminal), variantes de origen natural de la proteína PhtD y fragmentos inmunogénicos de la proteína PhtD (por ejemplo, fragmentos como se han descrito anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos del documento de patente WO00/37105 (las SEC ID N°: 4, 6, 8 o 10) o el documento de patente WO00/39299 (las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10 o 14) en los que dicho polipéptido es capaz de producir una respuestas inmunitarias específica para dicha secuencia de aminoácidos de los documentos de patente WO00/37105 o WO00/39299).

En particular, el término "PhtD", como se usa en el presente documento, incluye la proteína de longitud completa con la secuencia de señal unida, la proteína de longitud completa madura con el péptido de señal retirado (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N-terminal), variantes de origen natural de PhtD y fragmentos inmunogénicos de PhtD (por ejemplo, fragmentos como se han descrito anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos de los documentos de patente WO00/37105 o WO00/39299 en los que dicho polipéptido es capaz de provocar una respuestas inmunitarias específica para dicha secuencia de aminoácidos de PhtD de los documentos de patente WO00/37105 o WO00/39299 (por ejemplo, SEC ID N°: 4 del documento de patente WO 00/37105 o SEC ID N°: 14 del documento de patente WO 00/39299 para PhtD). Todas las formas de PhtD mencionadas anteriormente se pueden usar en la presente invención.

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

Algunos ejemplos de proteínas vehículo que se pueden usar en la presente invención son DT (toxóide de la difteria), TT (toxóide del tétanos) o un fragmento C de TT, DT CRM197 (un mutante de DT) otros mutantes puntuales de DT, tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida y col., J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; supresión o mutación de Glu-148 en Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 en Gly y otras mutaciones desveladas en los documentos de patente US 4709017 o US 4950740; mutación de al menos uno o más restos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en los documentos de patente US 5917017 o US 6455673; o un fragmento desvelado en el documento de patente US 5843711, neumolisina de neumococos (Kuo y col., (1995) Infect Immun 63; 2706-13) incluyendo una Ply detoxificada de la misma forma que, por ejemplo, dPLY-GMBS (documentos de patente WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht por ejemplo fusiones de PhtDE, fusiones de PhtBE (documentos de patente WO 01/98334 y WO 03/54007), (Pht A-E se describen con mayor detalle posteriormente) OMPC (proteína de membrana externa de meningococo - extraída habitualmente del serogrupo B de *N. meningitidis* - documento de patente EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae* - véase, por ejemplo, el documento de patente EP 0 594 610 B), o funciones inmunológicamente equivalentes de las mismas, péptidos sintéticos (documentos de patente EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos de patente WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos de patente WO 98/58668, EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (documento de patente WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden epítomos de linfocitos T humanos CD4+ de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi y col., (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tales como proteína N19 (Baraldoi y col., (2004) Infect Immun 72; 4884-7) proteína de superficie de neumococos PspA (documento de patente WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento de patente WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento de patente WO 00/61761).

Nurkka y col., Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11):1008-14, noviembre de 2004, describieron una vacuna de neumococos 11-valente con todos los serotipos conjugada con PD. Sin embargo, los presentes inventores han mostrado que la actividad opsonofagocítica mejoró para anticuerpos inducidos con conjugados que tienen 19F conjugado con DT en comparación con 19F conjugado con PD. Además, los presentes inventores han mostrado que se observa una mayor reactividad cruzada frente a 19A con 19F conjugado con DT. Por lo tanto, una característica de la composición de la presente invención es que el serotipo 19F se conjuga con DT o CRM 197. En un aspecto, el serotipo 19F se conjuga con DT. Los restantes serotipos de sacárido de la composición inmunogénica se pueden conjugar todos con una o más proteínas vehículo que no sean DT (es decir solo 19F se conjuga con DT), o se pueden dividir entre uno o más proteínas vehículo que no sean DT y el propio DT. En una realización más, 19F se conjuga con DT o CRM 197, y los restantes serotipos se dividen entre PD, y TT o DT o CRM 197. En una realización más, 19F se conjuga con DT o CRM 197 y no más de un sacárido se conjuga con TT. En un aspecto de esta realización, dicho un sacárido es 18C o 12F. En una realización más, 19F se conjuga con DT o CRM 197 y no más de dos sacáridos se conjugan con TT. En una realización más, 19F se conjuga con DT o CRM 197, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y DT o CRM 197. En una realización más, 19F se conjuga con DT o CRM 197, y

los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y neumolisina. En una realización más, 19F se conjuga con DT o CRM 197, y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y CRM 197. En una realización más, 19F se conjuga con DT o CRM197 y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT, neumolisina y opcionalmente PhtD o proteína de fusión PhtD/E. En una realización más 19F se conjuga con DT o CRM197, 19A se conjuga con neumolisina, uno (dos o tres) sacárido o sacáridos adicionales se conjugan con TT, un sacárido adicional se conjuga con neumolisina, 2 sacáridos adicionales se conjugan con PhtD o PhtD/E y todos los demás sacáridos se conjugan con PD.

El término "sacárido" puede indicar en la presente memoria descriptiva un polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan de bacterias y se pueden clasificar según el tamaño hasta cierto punto mediante técnicas conocidas (véanse, por ejemplo, los documentos de patente EP497524 y EP497525) y preferentemente mediante microfluidización. Los polisacáridos se pueden clasificar según el tamaño con el fin de reducir la viscosidad en las muestras de polisacárido y/o mejorar la capacidad de filtración de los productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un bajo número de unidades de repetición (por lo general 5-30 unidades de repetición) y son por lo general polisacáridos hidrolizados.

Algunos polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden unidades de repetición de oligosacárido que pueden contener hasta 8 restos de azúcar. Para una revisión de las unidades de oligosacárido para los serotipos principales de *Streptococcus pneumoniae* véase JONES, Christopher, Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria, An. Acad. Bras. Ciênc., junio de 2005, vol. 77, n° 2, p. 293-324, Tabla II ISSN 0001-3765. En una realización, un antígeno de sacárido capsular puede ser un polisacárido de longitud completa aunque, sin embargo, en otras puede ser una unidad de oligosacárido, o una cadena de sacárido más corta que la longitud nativa de las unidades de repetición de oligosacárido. En una realización, todos los sacáridos presentes en la vacuna son polisacáridos. Los polisacáridos de longitud completa se pueden "clasificar según el tamaño", es decir, su tamaño se puede reducir mediante diversos procedimientos tales como tratamiento de hidrólisis ácida, tratamiento con peróxido de hidrógeno, clasificación según el tamaño mediante emulsiflex® seguido un tratamiento con peróxido de hidrógeno para generar fragmentos de oligosacárido o microfluidización.

Los inventores también han indicado que el enfoque de la técnica ha sido usar oligosacáridos por la facilidad de la producción del conjugado. Los inventores han descubierto que mediante el uso de conjugados de polisacárido nativo o ligeramente clasificado según el tamaño, se pueden conseguir una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tiene alta inmunogenicidad que es filtrable, 2) la proporción del polisacárido con respecto a la proteína en el conjugado se puede alterar de modo que la proporción de polisacárido con respecto a la proteína (p/p) en el conjugado pueda disminuir (que también puede tener efecto en el efecto de supresión de vehículo), 3) los conjugados inmunogénicos propensos a hidrólisis se pueden estabilizar mediante el uso de sacáridos mayores para conjugación. El uso de polisacáridos mayores puede dar como resultado más entrecruzamiento entre el vehículo del conjugado y puede disminuir la liberación del sacárido libre del conjugado. Las vacunas de conjugado descritas en la técnica anterior tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación con el fin de mejorar la conjugación. Los presentes inventores han descubierto que las vacunas de conjugado de sacárido que conservan un mayor tamaño de polisacárido pueden proporcionar una buena respuesta inmunitaria frente a enfermedad por neumococos.

La composición inmunogénica de la invención puede comprender de ese modo uno o más conjugados de sacárido en los que el tamaño promedio (por ejemplo, peso molecular promedio en peso; M_w) de cada sacárido antes de la conjugación sea superior a 80 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa o 1000 kDa. En una realización uno o más conjugados de sacárido de la invención tendrían un tamaño promedio de sacárido previo a la conjugación de 50-1600, 80-1400, 100-1000, 150-500, o 200-400 kDa (se hace observar que cuando el tamaño promedio es M_w , las unidades 'kDa' se deberían reemplazar en el presente documento por ' $\times 10^3$ '). En una realización el conjugado posterior a la conjugación debería ser fácilmente filtrable a través de un filtro de 0,2 micrómetros de modo que se tenga un rendimiento de más de un 50, 60, 70, 80, 90 o un 95% posterior a filtración en comparación con la muestra previa a la filtración.

Para los fines de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido que no se ha sometido a ningún procedimiento (por ejemplo, purificación posterior), cuyo fin sea reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido se puede reducir ligeramente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. Tal sacárido es aún nativo. Solo si el polisacárido se ha sometido a técnicas de clasificación según el tamaño, el polisacárido no se consideraría nativo. El tamaño de un polisacárido nativo es, por ejemplo, de 250 kDa - 2.000 kDa, 400 - 1.500 kDa, 750 kDa - 1.250 kDa, 300 kDa - 600 kDa, 500-1.000 kDa, o 1.000-1.500 kDa teniendo los diferentes serotipos diferentes tamaños de polisacárido nativo como entenderán los expertos en la materia.

Para los fines de la invención, "clasificado según el tamaño en un factor de hasta x2" significa que los sacáridos se someten a un procedimiento destinado a reducir el tamaño del sacárido pero conservar un tamaño de más de la mitad del tamaño del polisacárido nativo. x3, x4, etc., se han de interpretar de la misma forma, es decir, el sacárido se somete a un procedimiento destinado a reducir el tamaño del polisacárido pero conservar un tamaño mayor de un tercio, un cuarto, etc., del tamaño del polisacárido nativo. En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados con una proteína vehículo, en los que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados con una proteína vehículo, en los que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* se clasifica según el tamaño en un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10. En una realización de este aspecto, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos se clasifican según el tamaño en un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10.

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

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

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

En una realización, los sacáridos de *S. pneumoniae* se clasifican según el tamaño mediante escisión mecánica, por ejemplo mediante microfluidización o sonicación. La microfluidización y la sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos mayores lo suficiente para proporcionar un conjugado filtrable. La clasificación según el tamaño es en un factor de no más de x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 o x2.

En una realización, la composición inmunogénica comprende conjugados de *S. pneumoniae* que se preparan a partir de una mezcla de polisacáridos y sacáridos nativos que se clasifican según el tamaño en un factor de no más de x20. En un aspecto de esta realización, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos se clasifican según el tamaño en un factor de hasta x2, x3, x4, x5 o x6.

En una realización, el sacárido de *Streptococcus pneumoniae* se conjuga con el vehículo de proteína a través de un engarce, por ejemplo un engarce bifuncional. El engarce es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, teniendo por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, dos grupos amino reactivos o dos grupos ácido carboxílico reactivos. El engarce tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible engarce es ADH. Otros engarces incluyen B-propionamido (documento de patente WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever y col., (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haluros de haloalquilo (US4057685), uniones glicosídicas (documentos de patente US4673574, US4808700), hexanodiamina y ácido 6-aminocaprónico (documento de patente US4459286). En una realización, ADH se usa como un engarce para conjugar un sacárido del serotipo 18C. En una realización, ADH se usa as un engarce para conjugar un sacárido del serotipo 22F.

Los conjugados de sacárido presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica de acoplamiento conocida. El procedimiento de conjugación puede depender de la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado se puede acoplar de ese modo directamente o a través de un grupo espaciador (engarce) a un grupo amino de la proteína vehículo. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que se podría acoplar al vehículo a través de una unión tioéter obtenida después de una reacción con una proteína vehículo activada con maleimida (por ejemplo usando GMBS) o una proteína vehículo haloacetilada (por ejemplo usando yodoacetimida [por ejemplo yodoacetimida de etilo HCl] o bromoacetato de N-succinimidilo o SIAB, o SIA, o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (preparado opcionalmente mediante química CDAP) se acopla con hexanodiamina o ADH y el sacárido derivatizado con amino se conjuga con la proteína vehículo usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo de la proteína vehículo. Tales conjugados se describen en el documento de solicitud publicada PCT WO 93/15760 de Universidad de Servicios Informados y los documentos de patente WO 95/08348 y WO 96/29094.

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

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

Un procedimiento adicional implica el acoplamiento de un sacárido activado con bromuro de cianógeno (o CDAP) derivatizado con dihidrazida de ácido adípico (ADH) a la proteína vehículo mediante condensación con carbodiimida

(Chu C. y col., Infect. Immunity, 1983 245 256), usando, por ejemplo, EDAC.

En una realización, un grupo hidroxilo (preferentemente un grupo hidroxilo activado por ejemplo un grupo hidroxilo activado para preparar un éster de cianato [por ejemplo, con CDAP]) de un sacárido se une a un grupo amino o un grupo carboxílico de una proteína directa o indirectamente (a través de un engarce). Cuando está presente un engarce, un grupo hidroxilo de un sacárido se une preferentemente a un grupo amino de un engarce, por ejemplo mediante el uso de conjugación con CDAP. Un grupo amino adicional del engarce (por ejemplo ADH) se puede conjugar con un grupo ácido carboxílico de una proteína, por ejemplo mediante el uso de química de carbodiimida, por ejemplo mediante el uso de EDAC. En una realización, el sacárido o sacáridos capsulares de neumococos se conjuga primero con el conector antes de que el conector se conjugue con la proteína vehículo. Como alternativa, el conector se puede conjugar con el vehículo antes de la conjugación con el sacárido.

También se puede usar una combinación de técnicas, preparándose algunos conjugados de sacárido-proteína mediante CDAP, y otros mediante aminación reductora.

En general, se pueden usar los siguientes tipos de grupos químicos de una proteína vehículo para acoplamiento / conjugación:

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

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

C) Sulfidrido (por ejemplo a través de cisteína). En una realización este grupo se une a un sacárido o engarce bromo o cloroacetilado con química de maleimida. En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobencidina.

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

E) Grupo imidazolilo (por ejemplo a través de histidina). En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobencidina.

F) Grupo guanidilo (por ejemplo a través de arginina).

G) Grupo indolilo (por ejemplo a través de triptófano).

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

Enfoques de acoplamiento directo:

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH₂-Prot ----> conjugado Sacárido-aldehído + NH₂-Prot ----> base de Schiff + NaCNBH₃ ----> conjugado Sacárido-COOH + NH₂-Prot + EDAC ----> conjugado Sacárido-NH₂ + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

Enfoques de acoplamiento indirecto a través de espaciador (engarce):

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

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

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

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

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

Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂---SH ----> sacárido---SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u

obtenida después de modificación de los grupos amino de la proteína mediante SPDP por ejemplo) -----> sacárido-S-S-Prot

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

5 Sacárido-COOH + EDAC + NH₂----SH -----> Sacárido-SH + haloacetilada-Prot ----> Conjugado

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

Nota: en lugar de la EDAC anterior, se puede usar cualquier carbodiimida adecuada.

10 Resumen, los tipos de grupo químico de proteína vehículo que se pueden usar generalmente para acoplamiento con un sacárido son grupos amino (por ejemplo en restos de lisina), grupos COOH (por ejemplo en restos de ácido aspártico y glutámico) y grupos SH (si fueran accesibles (por ejemplo en restos de cisteína)).

15 Preferentemente la proporción de la proteína vehículo con respecto al sacárido de *S. pneumoniae* está entre 1:5 y 5:1; por ejemplo entre 1:0.5-4:1, 1:1-3.5:1, 1.2:1-3:1, 1.5:1-2.5:1; por ejemplo entre 1:2 y 2.5:1; 1:1 y 2:1 (p/p). En una realización, la mayoría de los conjugados, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los conjugados tienen una proporción de proteína vehículo con respecto al sacárido que es mayor de 1:1, por ejemplo 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1 o 1.6:1.

20 En una realización, se conjuga al menos un sacárido de *S. pneumoniae* con una proteína vehículo a través de un engarce usando CDAP y EDAC. Por ejemplo, 18C o 22F se pueden conjugar con una proteína a través de un engarce (por ejemplo, los que tienen dos grupos hidrazino en sus extremos tales como ADH) usando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Cuando se usa un engarce, se puede usar CDAP para conjugar el sacárido con un engarce y a continuación se puede usar EDAC para conjugar el engarce con una proteína o, como alternativa, se puede usar en primer lugar EDAC para conjugar el engarce con una proteína, después de lo cual se puede usar CDAP para conjugar el engarce con el sacárido.

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

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

35 "Alrededor de" o "aproximadamente" se definen como dentro de un 10 % más o menos de la cifra dada para los fines de la invención.

40 En una realización, al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* se conjuga directamente con una proteína vehículo (por ejemplo, usando una de las químicas descritas anteriormente). Preferentemente, el al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* se conjuga directamente con CDAP. En una realización, la mayoría de los sacáridos capsulares, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9 o más se conjugan directamente con la proteína vehículo mediante CDAP (véanse los documentos de patente WO 95/08348 y WO 96/29094).

45 La composición inmunogénica puede comprender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*, denominadas en el presente documento proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención. Tales proteínas se pueden usar como proteínas vehículo, o pueden estar presentes como proteínas libres, o pueden estar presentes tanto como proteínas vehículo como proteínas libres. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención están en la superficie expuesta, al menos durante parte del ciclo de vida de los neumococos, o son proteínas que los neumococos segregan o liberan. Preferentemente, las proteínas de la invención se seleccionan entre las siguientes categorías, tales como proteínas que tienen un motivo de secuencia de Señal de Tipo II de LXXC (en el que X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia de la tríada de polihistidina (PhtX)), proteínas de unión a colina (CbpX), proteínas que tienen un motivo de secuencia de Señal de Tipo I (por ejemplo, Sp101), proteínas que tienen un motivo LPXTG (en el que X es cualquier aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130), y toxinas (por ejemplo, Ply). Algunos ejemplos preferentes de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas, o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas.

55 En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos 1 proteína seleccionada entre el grupo que consiste en la familia de la Tríada de Polihistidina (PhtX), familia de Proteínas de Unión a Colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de Lynx, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncados de CbpX-

truncados de LytX (o fusiones), neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. En una realización más, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en la familia de la Tríada de Polihistidina (PhtX), familia de Proteínas de Unión a Colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de Lynx, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncados de CbpX-truncados de LytX (o fusiones), neumolisina (Ply), PspA, PsaA, y Sp128. En una realización más, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en la familia de la Tríada de Polihistidina (PhtX), familia de Proteínas de Unión a Colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de LynX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncados de CbpX-truncados de LytX (o fusiones), neumolisina (Ply), y Sp128.

La familia Pht (Tríada de Polihistidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente implicadas en unión o actividad enzimática de metales o nucleósidos, (3-5) regiones de bucles superenrollados, un extremo N-terminal conservado y un extremo C-terminal heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos sometidas al ensayo. También se han descubierto proteínas homólogas en otros estreptococos y neisserias. En una realización de la invención, la proteína Pht de la invención es PhtD. Sin embargo, se entiende que los términos Pht A, B, D, y E se refieren a proteínas que tienen secuencias desveladas en las citas mostradas posteriormente así como variantes de origen natural (y preparadas por el hombre) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es al menos un 90 % idéntica a las proteínas de referencia. Preferentemente, es al menos un 95% idéntica y lo más preferente es un 97% idéntica.

Con respecto a las proteínas PhtX, PhtA se desvela en el documento de patente WO 98/18930, y también se denomina Sp36. Como se ha indicado anteriormente, es una proteína de la familia de la tríada de la polihistidina y tiene un motivo de señal de tipo II de LXXC. PhtD se desvela en el documento de patente WO 00/37105, y también se denomina Sp036D. Como se ha indicado anteriormente, es una proteína de la familia de la tríada de la polihistidina y tiene un motivo de señal de tipo II de LXXC. PhtB se desvela en el documento de patente WHO 00/37105, y también se denomina Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el Polipéptido de Degradación de C3, como se desvela en el documento de patente WO 00/17370. Esta proteína es también de la familia de la tríada de la polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II LXXC. Un equivalente inmunológicamente funcional preferente es la proteína Sp42 desvelada en el documento de patente WO 98/18930. Se desvela un truncado de PhtB (aproximadamente 79kD) en el documento de patente WO99/15675 que también se considera un miembro de la familia PhtX. PhtE se desvela en el documento de patente WO00/30299 y se denomina BVH-3. Cuando se hace referencia a cualquier proteína Pht en el presente documento, se pretende indicar que se pueden usar fragmentos o fusiones inmunogénicas de la misma de la proteína Pht. Por ejemplo, la referencia a PhtX incluye los fragmentos o fusiones inmunogénicas de la misma de cualquier proteína Pht. La referencia a PhtD o PhtB también es una referencia a fusiones de PhtDE o PhtBE como se encuentra, por ejemplo, en el documento de patente WO0198334.

La neumolisina es una toxina polifuncional con distintas actividades citolítica (hemolítica) y de activación del complemento (Rubins y col., Am. Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). Los neumococos no segregan la toxina, pero se libera tras la lisis de los neumococos después de la influencia de autolisina. Sus efectos incluyen, por ejemplo, estimulación de la producción de citoquinas inflamatorias por los monocitos humanos, inhibición del batido de los cilios en el epitelio respiratorio humano, y disminución de la actividad bactericida y la migración en neutrófilos. El efecto más evidente de la neumolisina es la lisis de los glóbulos rojos, que implica la unión a colesterol. Debido a que es una toxina, necesita detoxificarse (es decir, no ser tóxica para un ser humano cuando se proporciona con una dosificación adecuada para protección) antes de administrarse *in vivo*. La expresión y la clonación de neumolisina nativa o de tipo silvestre se conocen la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y col., (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell y col., (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) y Mitchell y col., (NAR, 18:4010 (1990)). La detoxificación de Ply se puede realizar mediante medios químicos, por ejemplo, someter a tratamiento con formalina o glutaraldehído o una combinación de ambos (documentos de patente WO 04081515, PCT/EP2005/010258). Tales procedimientos se conocen bien en la técnica para varias toxinas. Como alternativa, Ply se puede detoxificar genéticamente. De ese modo, la invención incluye derivados de proteínas de neumococos que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutado" se usa en el presente documento para indicar una molécula que experimenta la supresión, adición o sustitución de uno o más aminoácidos usando técnicas bien conocidas de mutagénesis dirigida a sitio o cualquier otro procedimiento convencional. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, una proteína Ply mutante se puede alterar de modo que sea biológicamente inactiva mientras que aún mantenga sus epítomos inmunogénicos; véase, por ejemplo, el documento de patente WO90/06951, Berry y col., (Infect Immun, 67:981-985 (1999)) y el documento de patente WO99/03884.

Como se usa en el presente documento, se ha de entender que el término "Ply" se refiere a una neumolisina mutada o detoxificada adecuada para uso médico (es decir, no tóxica).

En lo que se refiere a la familia de Proteínas de Unión a Colina (CbpX), los miembros de esa familia se identificaron originalmente como proteínas de neumococos que se podían purificar mediante cromatografía de afinidad por colina. Todas las proteínas de unión a colina están unidas no covalentemente a restos de fosforilcolina de ácido teicoico de la pared celular y ácido lipoteicoico asociado a membrana. Estructuralmente, tienen varias regiones en común con la familia completa, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión a colina comprenden una región N-terminal (N), regiones de repetición conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión a colina conservada (C), compuesta

por múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se usa en la presente solicitud, la expresión "familia de Proteínas de Unión a Colina (CbpX)" se selecciona entre el grupo que consiste en Proteínas de Unión a Colina que se identifican en el documento de patente WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. CbpA se desvela en el documento de patente WO97/41151. CbpD y CbpG se desvelan en el documento de patente WO00/29434. PspC se desvela en el documento de patente WO97/09994. PbcA se desvela en el documento de patente WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a Colina desvelada en el documento de patente WO 98/39450. Las Proteínas de Unión a Colina preferentes se seleccionan entre el grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Otra realización preferente es los truncados de CbpX en los que "CbpX" se define como anteriormente y "truncados" se refiere a proteínas CbpX que carecen de un 50 % o más de la región de unión a colina (C). Preferentemente tales proteínas carecen de la región de unión a colina entera. Más preferentemente, tales truncados de proteína carecen de (i) la región de unión a colina y (ii) también una parte de la mitad N-terminal de la proteína, conservando aún al menos una región de repetición (R1 o R2). Aún más preferentemente, el truncado tiene 2 regiones de repetición (R1 y R2). Algunos ejemplos de tales realizaciones preferentes son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en los documentos de patente WO99/51266 o WO99/51188 aunque, sin embargo, también se contemplan dentro del alcance de la presente invención otras proteínas de unión a colina que carecen de una región de unión a colina similar.

La familia LytX son proteínas asociadas a membrana asociadas a la lisis celular. El dominio N-terminal comprende un dominio o dominios de unión a colina aunque, sin embargo, la familia LytX no tiene todas las características encontradas en la familia CbpA indicada anteriormente y, de ese modo, para la presente invención, la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. A diferencia de la familia CbpX, el dominio C-terminal contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas LytX. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia LytX, LytA se desvela en Ronda y col., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB se desvela en el documento de patente WO 98/18930, y también se denomina Sp46. LytC también se desvela en el documento de patente WO 98/18930, y también se denomina Sp91. Un miembro preferente de esa familia es LytC.

Otra realización preferente son los truncados de LytX en los que "LytX" se define como anteriormente y "truncados" se refiere a proteínas LytX que carecen de un 50 % o más de la región de unión a colina (C). Preferentemente, tales proteínas carecen de la región de unión a colina entera. Otra realización preferente más de la presente invención son proteínas quiméricas de truncados de CbpX-truncados de LytX (o fusiones). Preferentemente, esta comprende NR1xR2 (o R1xR2) de CbpX y la parte C-terminal (Cterm, es decir, que carece de los dominios de unión a colina) de LytX (por ejemplo, LytCCterm o Sp91Cterm). Más preferentemente CbpX se selecciona entre el grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Aún más preferentemente, es CbpA. Preferentemente, LytX es LytC (también denominada Sp91). Otra realización de la presente invención es un truncado de PspA o PsaA que carece del dominio de unión a colina (C) y se expresa como una proteína de fusión con LytX. Preferentemente, LytX es LytC.

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

Sp128 y Sp130 se desvelan en el documento de patente WO00/76540. Sp125 es un ejemplo de una proteína de superficie de neumococos con el motivo de Anclado de Pared Celular de LPXTG (en el que X es cualquier aminoácido). Se ha descubierto que cualquier proteína dentro de esta clase de proteínas de superficie de neumococos con este motivo es útil dentro del contexto de la presente invención, y por lo tanto se considera una proteína adicional de la invención. La propia Sp125 se desvela en el documento de patente WO 98/18930, y también se conoce como ZmpB - una metaloproteínasa de cinc. Sp101 se desvela en el documento de patente WO 98/06734 (en el que tiene la referencia nº y85993). Se caracteriza por una secuencia de señal de Tipo I. Sp133 se desvela en el documento de patente WO 98/06734 (en el que tiene la referencia nº y85992). También se caracteriza por una secuencia de señal de Tipo I.

Algunos ejemplos de antígenos de proteína de *Moraxella catarrhalis* preferentes que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) son: OMP106 [documento de patente WO 97141731 (Antex) y documento de patente WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 o fragmentos de la misma [documento de patente WO 0018910]; LbpA y/o LbpB [documento de patente WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documentos de patente WO 97/13785 y WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col., (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento de patente WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HasR [documento de patente PCT/EP99/03824]; PilQ [documento de patente PCT/EP99/03823]; OMP85 [documento de patente PCT/EP00/01468]; lipo06 [documento de patente GB 9917977.2]; lipo10 [documento de patente GB 9918208.1]; lipo11 [documento de patente GB 9918302.2]; lipo18 [documento de patente GB 9918038.2]; P6 [documento de patente PCT/EP99/03038]; D15 [documento de patente PCT/EP99/03822]; OmpA1 [documento de patente PCT/EP99/06781]; Hly3 [documento de patente PCT/EP99/03257]; y OmpE. Algunos ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipables o fragmentos de los mismos que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) incluyen: proteína Fimbrina [(documento de patente US 5766608 - Fundación de Investigación de Ohio State)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma [por ejemplo, fusiones de péptido LB1(f); documento de patente US 5843464 (OSU) o documento de patente WO

99/64067]; OMP26 [documento de patente WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento de patente EP 281673 (Universidad del Estado de Nueva York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento de patente WO 94/12641); P2; y P5 (documento de patente WO 94/26304).

Las proteínas de la invención también se pueden combinar de forma beneficiosa. Por combinar se pretende indicar que la composición inmunogénica comprende todas las proteínas de entre las siguientes combinaciones, ya sea como proteínas vehículo o como proteínas libres o como una mezcla de las dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas como se expone en lo sucesivo en el presente documento, ambas proteínas se pueden usar como proteínas vehículo, o ambas proteínas pueden estar presentes como proteínas libres, o ambas pueden estar presentes como proteína vehículo y como proteína libre, o una puede estar presente como una proteína vehículo y una proteína libre mientras que la otra está presente solamente como una proteína vehículo o solamente como una proteína libre, o una puede estar presente como una proteína vehículo y la otra como una proteína libre. Cuando se da una combinación de tres proteínas, existen posibilidades similares. Las combinaciones preferentes incluyen, pero no se limitan a, PhtD + NR1xR2, proteínas quiméricas o de fusión PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, proteínas quiméricas o de fusión PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferentemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Más preferentemente es de CbpA. Otras combinaciones incluyen combinaciones de 3 proteínas tales como PhtD + NR1xR2 + Ply, y PhtA + NR1xR2 + PhtD. En una realización, la composición de vacuna comprende neumolisina detoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas vehículo. En una realización más, la composición de vacuna comprende neumolisina detoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas libres.

La presente invención también proporciona una vacuna que contiene las composiciones inmunogénicas de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona un procedimiento para fabricar una vacuna que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de la invención con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las vacunas de la presente invención pueden incluir adyuvantes, particularmente cuando se destinan para su uso en una población de edad avanzada pero también para su uso en poblaciones de niños. Algunos adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alumbre, pero también puede ser una sal de calcio, magnesio, hierro o cinc, y puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, sacáridos derivatizados catiónica y aniónicamente, o polifosfazenos.

Es preferente que el adyuvante se seleccione para que sea un inductor preferente de un tipo TH1 de respuesta. Tales niveles elevados de citoquinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células frente a un antígeno dado, mientras que los niveles elevados de citoquinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunitarias humores frente al antígeno.

La distinción de las respuestas inmunitarias de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo apoyará una respuesta inmunitaria que se describe que es principalmente Th1 o principalmente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de lo descrito por clones de linfocitos T murinos CD4 +ve T en Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 y TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se asocian a la producción de las citoquinas INF- γ y IL-2 por los linfocitos T. Otras citoquinas asociadas a menudo directamente con la inducción de las respuestas inmunitarias de tipo Th1 no se producen mediante las los linfocitos T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 están asociadas a la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Algunos sistemas adyuvantes adecuados que estimulan una respuesta principalmente Th1 incluyen: monofosforil lípido A o un derivado del mismo, particularmente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación, véase el documento de patente GB 2220211 A); y una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con una sal de aluminio (por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En tales combinaciones, el antígeno y 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras formadas por partículas, permitiendo un suministro más eficaz de las señales antigénicas e inmunoestimuladoras. Los estudios han mostrado que 3D-MPL es capaz de mejorar además la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido sobre alumbre [Thoelen y col., Vaccine (1998) 16:708-14; documento de patente EP 689454-B1].

Un sistema mejorado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento de patente WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se inactiva con colesterol como se desvela en el documento de patente WO 96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento de patente WO 95/17210. En una realización la composición inmunogénica comprende además una saponina, que puede ser QS21. La formulación también puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol (WO 95/17210). Los oligonucleótidos que contienen CpG sin metilar (documento de patente WO 96/02555) y otros oligonucleótidos inmunomoduladores (documentos de patente WO0226757 y WO03507822) también son inductores preferentes de una respuesta TH1 y son adecuados para su uso en la presente invención.

Algunos adyuvantes particulares son los seleccionados entre el grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores de tipo Toll (en particular agonistas de receptores 2 de tipo Toll, agonistas de receptores 3 de tipo Toll, agonistas de receptores 4 de tipo Toll, agonistas de receptores 7 de tipo Toll, agonistas de receptores 8 de tipo Toll y agonistas de receptores 9 de tipo Toll), saponinas o combinaciones de los mismos.

- 5 Un adyuvante que se puede usar con las composiciones de vacuna de la invención son las preparaciones de ampollas o vesículas de membrana exterior de cepas de bacterias Gram negativas tales como las enseñadas en el documento de patente WO02/09746 - particularmente ampollas de *N. meningitidis*. Las propiedades adyuvantes de las ampollas pueden mejorar por retención de LOS (lipooligosacáridos) en su superficie (por ejemplo, a través de la extracción con bajas concentraciones de detergente [por ejemplo un 0-0,1 % de desoxicolato]). Los se pueden detoxificar a través de las mutaciones msbB(-) o htrB(-) discutidas en el documento de patente WO02/09746. Las propiedades adyuvantes también se pueden mejorar por retención de PorB (y opcionalmente retirada de PorA) de ampollas de meningococos. Las propiedades adyuvantes también se pueden mejorar truncando la estructura de sacárido de núcleo exterior de LOS en ampollas de meningococos - por ejemplo a través de la mutación lgtB(-) discutida en el documento de patente WO2004/014417. Como alternativa, los mencionados anteriormente (por ejemplo, aislados a partir de una cepa msbB(-) y/o lgtB(-)) se pueden purificar y usar como un adyuvante en las composiciones de la invención.

- Un adyuvante adicional que se puede usar con las composiciones de la invención se puede seleccionar entre el grupo: una saponina, lípido A o un derivado del mismo, un oligonucleótido inmunoestimulador, un glucosaminida fosfato de alquilo, una emulsión de aceite en agua o combinaciones de los mismos. Un adyuvante preferente adicional es una sal metálica junto con otro adyuvante. Es preferente que el adyuvante sea un agonista de receptores de tipo Toll en particular un agonista de receptores 2, 3, 4, 7, 8 o 9 de tipo Toll, o una saponina, en particular Qs21. Es además preferente que el sistema adyuvante comprenda dos o más adyuvantes de la lista anterior. En particular las combinaciones contienen preferentemente un adyuvante de saponina (en particular Qs21) y/o un agonista de receptores 9 de tipo Toll tal como un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG. Otras combinaciones preferentes contienen una saponina (en particular Qs21) y un agonista de receptores 4 de tipo Toll tal como monofosforil lípido A o su derivado 3 desacilado, 3 D - MPL, o una saponina (en particular Qs21) y un agonista de receptores 4 de tipo Toll tal como un glucosaminida fosfato de alquilo.

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

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

- 3 D -MPL está disponible en GlaxoSmithKline Biologicals North America y estimula principalmente respuestas de linfocitos T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Se pueden producir de acuerdo con los procedimientos que se desvelan en el documento de patente GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Preferentemente, en las composiciones de la presente invención se usa 3 D- MPL de partícula pequeña. 3 D -MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que se puede filtrar hasta esterilidad a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en el documento de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/21292. Se conocen los derivados sintéticos del lípido A y se sabe que son agonistas de TLR 4 incluyendo, pero sin limitación:

- OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento de patente WO 95/14026)
- OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documentos de patente WO99 /64301 y WO 00/0462)
- OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento de patente WO 01/46127)

- Otros ligandos de TLR4 que se pueden usar son glucosaminida fosfatos de alquilo (AGP) tales como los que se desvelan en los documentos de patente WO9850399 o US6303347 (también se desvelan procedimientos para preparación de AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se desvelan en el documento de patente US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se enseña que ambos son útiles como adyuvantes.

Otro inmunoestimulador preferente para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de América del Sur *Quillaja saponaria Molina* y se describió por primera

vez que tiene actividad adyuvante por Dalsgaard y col., en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, springer Verlag, Berlín, p 243-254). Se han aislado fragmentos purificados de Quil A mediante HPLC que conservan la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada a Quil A (documento de patente EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria Molina* que incluye linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, células Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante y es una saponina preferente en el contexto de la presente invención.

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

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

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

También se pueden usar oligonucleótidos inmunoestimuladores o cualquier otro agonista de receptores 9 de tipo Toll (TLR) 9. Los oligonucleótidos preferentes para su uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, preferentemente que contienen dos o más motivos de CpG dinucleótido separados por al menos tres, más preferentemente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo de CpG es un nucleótido de citosina seguido de un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son por lo general desoxinucleótidos. En una realización preferente, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferentemente un enlace fosforotioato, aunque fosfodiéster y otros enlaces internucleótido están dentro del alcance de la invención. También se incluyen dentro del alcance de la invención oligonucleótidos con uniones internucleótido mixtas. Algunos procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos de patente US5.666.153, US5.278.302 y WO95/26204.

Algunos ejemplos de oligonucleótidos preferentes tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen preferentemente uniones internucleótido modificadas de fosforotioato.

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

Algunos oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferentes anteriores en las que hay supresiones o adiciones inconsecuentes en las mismas.

Los oligonucleótidos CpG usados en la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, véase el documento de patente EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos se pueden sintetizar usando un sintetizador automatizado.

El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua o puede comprender una emulsión de aceite en agua en combinación con otros adyuvantes. La fase oleosa del sistema de emulsión comprende preferentemente un aceite metabolizable. El significado del término metabolizable se conoce bien en la técnica. Metabolizable se puede definir como "ser capaz de ser transformado mediante metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, pescado, aceite, aceite animal o sintético, que no es tóxico para el receptor y es capaz de ser transformado por el metabolismo. Algunas fuentes comunes de aceites vegetales son nueces, semillas, y granos. Algunos aceites sintéticos también forma parte de la presente invención y pueden incluir aceites disponibles en el mercado tales como NEOBEE® y otros. El escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaculado que se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en cantidades menores en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levadura, y es un aceite particularmente preferente para uso en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un compuesto intermedio en la biosíntesis del colesterol (índice de Merck, 10ª edición, entrada n° 8619).

A menudo, también se usan tocoles (por ejemplo, vitamina E) en adyuvantes de emulsiones de aceite (documentos

de patente EP 0 382 271 B1; US5667784; WO 95/17210). Algunos tocoles usados en las emulsiones de aceite (preferentemente emulsiones de aceite en agua) de la invención se pueden formular como se describe en el documento de patente EP 0 382 271 B1, en el que los tocoles pueden ser dispersiones de gotitas de tocol, que comprenden opcionalmente un agente emulgente, con un diámetro preferentemente inferior a 1 micrómetro. Como alternativa, los tocoles se pueden usar en combinación con otro aceite, para formar la fase oleosa de una emulsión de aceite. Algunos ejemplos de emulsiones de aceite que se pueden usar en combinación con el tocol se describen en el presente documento, tales como los aceites metabolizables que se han descrito anteriormente.

Se ha sugerido que algunos adyuvantes de emulsión de aceite en agua *per se* son útiles como composiciones de adyuvante (documento de patente EP 0 399 843B), también se han descrito como adyuvantes para vacunas algunas composiciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos (documentos de patente WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsión de aceite, tales como emulsiones de agua en aceite (documentos de patente US 5.422.109; EP 0 480 982 B2) y emulsiones de agua en aceite en agua (documentos de patente 5.424.067; EP 0 480 981 B). Todos ellos forman sistemas precedentes de emulsión de aceite (en particular cuando se incorporan tocoles) para formar adyuvantes y composiciones de la presente invención.

Más preferentemente, la emulsión de aceite (por ejemplo emulsiones de aceite en agua) comprende adicionalmente un agente emulgente tal como TWEEN 80 y/o a esterol tal como colesterol.

Una emulsión de aceite preferente (preferentemente emulsión de aceite en agua) comprende un aceite no tóxico metabolizable, tan como escualeno, escualeno o un tocoferol tal como alfa tocoferol (y preferentemente tanto escualeno como alfa tocoferol) y opcionalmente un agente emulgente (o tensioactivo) tal como Tween 80. También se puede incluir un esterol (preferentemente colesterol). El experto en la materia conoce bien el procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua. Normalmente, el procedimiento comprende la mezcla de la fase oleosa que contiene tocol con una solución de tensioactivo tal como PBS/TWEEN80™, seguido de homogenización usando una homogeneizadora, y debería ser evidente para un experto en la materia que un procedimiento que comprende pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para la homogeneización de pequeños volúmenes de líquido. Del mismo modo, el experto en la materia podría adaptar el procedimiento de emulsión en microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares)) para producir volúmenes menores o mayores de emulsión. La adaptación se podría conseguir mediante experimentación de rutina que comprende la medida de la emulsión resultante hasta que se consiguiera una preparación con gotitas de aceite de diámetro requerido. En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el agente emulgente deberían estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

El tamaño de las gotitas de aceite encontrado dentro de la emulsión de aceite en agua estable es preferentemente inferior a 1 micrómetro, puede estar en el intervalo de básicamente 30-600 nm, preferentemente con un diámetro básicamente de aproximadamente 30-500 nm, y lo más preferentemente con un diámetro de básicamente 150-500 nm, y en particular con un diámetro de aproximadamente 150 nm cómo se mide mediante espectroscopía de correlación fotónica. A este respecto, un 80 % de las gotitas de aceite en número debería estar dentro de los intervalos precedentes, más preferentemente más de un 90 % y lo más preferentemente más de un 95 % de las gotitas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones de aceite de la presente invención están convencionalmente en el intervalo de un 0,5-20 % o de un 2 % a un 10 % de aceite (del volumen de la dosis total), tal como escualeno; y cuando está presente, de un 2 % a un 10 % de alfa tocoferol; y de un 0,3 % a un 3 % de tensioactivo, tal como monooleato de polioxietileno y que sorbitán. Preferentemente, la proporción de aceite (preferentemente escualeno): tocol (preferentemente α -tocoferol) es igual o inferior a 1 ya que esta proporciona una emulsión más estable. Un agente emulgente, tal como Tween80 o Span 85 también puede estar presente a un nivel de aproximadamente un 1 %. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante.

Algunos ejemplos de sistemas de emulsión preferentes se describen en los documentos de patente WO 95/17210, WO 99/11241 y WO 99/12565 que desvelan adyuvantes de emulsión basados en escualeno, α -tocoferol, y TWEEN 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimuladores QS21 y/o 3D-MPL.

Por lo tanto, en una realización particularmente preferente de la presente invención, el adyuvante de la invención puede comprender adicionalmente inmunoestimuladores adicionales, tales como LPS o derivados de los mismos, y/o saponinas. Algunos ejemplos de inmunoestimuladores se describen en el presente documento y en "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volumen 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

En un aspecto preferente, las composiciones de adyuvante e inmunogénicas de acuerdo con la invención comprenden una saponina (preferentemente QS21) y/o un derivado de LPS (preferentemente 3D-MPL) en una emulsión de aceite descrita anteriormente, opcionalmente con un esterol (preferentemente colesterol). Además la emulsión de aceite (preferentemente emulsión de aceite en agua) puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina. Algunos adyuvantes que comprenden una emulsión de aceite en agua, un esterol y una saponina se describen en el documento de patente WO 99/12565.

Por lo general, para administración al ser humano, la saponina (preferentemente QS21) y/o derivado de LPS (preferentemente 3D-MPL) estarán presentes en una dosis para ser humano de composición inmunogénica en el

intervalo de 1 µg – 200 µg, tal como 10- 100 µg, preferentemente 10 µg - 50 µg por dosis. Por lo general, la emulsión de aceite (preferentemente emulsión de aceite en agua) comprenderá de un 2 % a un 10 % de aceite metabolizable. Preferentemente, comprenderá de un 2 % a un 10 % de escualeno, de un 2 % a un 10 % de alfa tocoferol y de un 0,3 % a un 3 % (preferentemente un 0,4 % - 2 %) de agente emulgente (preferentemente Tween 80 [monooleato de polioxietileno y sorbitán]). Cuando están presentes tanto el escualeno como el alfa tocoferol, la proporción de escualeno: alfa tocoferol es preferentemente igual o inferior a 1 ya que esta proporciona una emulsión más estable. El Span 85 (trioleato de Sorbitán) también puede estar presente a un nivel de un 0,5 % a un 1 % en las emulsiones usadas en la invención. En algunos casos, puede ser ventajoso que las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante, por ejemplo otros emulgentes/tensioactivos, incluyendo ácido caprílico (índice de Merck 10ª Edición, entrada nº 1739), de los cuales es particularmente preferente la Tricaprilina.

Cuando se incluye escualeno y una saponina (preferentemente QS21), también es beneficioso incluir un esteroide (preferentemente colesterol) a la formulación ya que esto permite una reducción en el nivel total de aceite en la emulsión. Esto conduce a una reducción del coste de fabricación, aumento de la comunidad general de la vacuna, y también a mejoras cualitativas y cuantitativas de las respuestas inmunitarias resultantes, tales como aumento de la producción de IFN-γ. Por consiguiente, el sistema adyuvante de la presente invención por lo general comprende la proporción de aceite:saponina (p/p) metabolizable en el intervalo de 200:1 a 300:1, la presente invención también se puede usar en una forma de "aceite inferior" cuyo rango preferente es de 1:1 a 200:1, preferentemente de 20:1 a 100:1, y lo más preferentemente básicamente de 48:1, esta vacuna mantiene las propiedades adyuvantes beneficiosas de todos los componentes, con un perfil de reactogenicidad muy reducido. Por consiguiente, las realizaciones particularmente precedentes tienen una proporción de escualeno:QS21 (p/p) en el intervalo de 1:1 a 250:1, también un intervalo preferente es de 20:1 a 200:1, preferentemente de 20:1 a 100:1, y lo más preferentemente básicamente 48:1. Preferentemente también se incluye un esteroide (lo más preferentemente colesterol) para que esté presente en una proporción de saponina:esteroide como se describe en el presente documento.

Los sistemas de emulsión de la presente invención tienen preferentemente un tamaño de gotita de aceite pequeño en el intervalo submicrométrico. Más preferentemente, los tamaños de la gotita de aceite estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, y lo más preferentemente con un diámetro de 120-600 nm. Una formulación de adyuvante particularmente potente (para la última combinación con AIPO₄ en las composiciones inmunogénica es de la invención) plica una saponina (preferentemente QS21), un derivado de LPS (preferentemente 3D-MPL) y una emulsión de aceite (preferentemente escualeno y alfa tocoferol en una emulsión de aceite en agua) como se describe en el documento de patente WO 95/17210 o en el documento de patente WO 99/12565 (en particular la formulación 11 de adyuvante en el Ejemplo 2, Tabla 1).

Algunos ejemplos de un agonista de TLR 2 incluyen peptidoglicano o lipoproteína. Algunas imidazoquinolinas, tales como Imiquimod y Resiquimod son agonistas de TLR7 conocidos. El ARN monocatenario también es un agonista de TLR conocido (TLR8 en seres humanos y TLR7 en ratones), mientras que el ARN bicatenario y poli IC (ácido poliinosínico-policitidílico -un mimético sintético comercial de ARN viral) son ejemplos de agonistas de TLR 3. 3D-MPL es un ejemplo de un agonista de TLR4 mientras que CPG es un ejemplo de un agonista de TLR9.

La composición inmunogénica puede comprender un antígeno y un inmunoestimulador adsorbido sobre una sal metálica. Algunas formulaciones de vacuna basadas en aluminio en las que el antígeno y el inmunoestimulador 3-des-O-acilado monofosforil lípido A (3D-MPL), se adsorben sobre la misma partícula se describen en los documentos de patente EP 0 576 478 B1, EP 0 689 454 B1, y EP 0 633 784 B1. En estos casos, entonces el antígeno se adsorbe primero sobre la sal de aluminio seguido de la adsorción del 3D-MPL inmunoestimulador sobre las mismas partículas de sal de aluminio. Tales procedimientos implican primero la suspensión de 3D-MPL mediante sonicación en un baño de agua hasta que las partículas alcanzan un tamaño entre 80 y 500 nm. Por lo general, el antígeno se adsorbe sobre la sal de aluminio durante una hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación, la suspensión de 3D-MPL se añade al antígeno adsorbido y la formulación se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora y después se mantiene a 4 °C hasta su uso.

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

Por consiguiente, la presente invención proporciona una formulación de adyuvante que comprende un inmunoestimulador que se ha adsorbido sobre una partícula de sal metálica, caracterizada por que la composición está básicamente libre de otro antígeno. Además, esta formulación de adyuvante puede ser un compuesto intermedio que, si se usa para adyuvante, se necesita para la fabricación de una vacuna. Por consiguiente se

proporciona un procedimiento para la fabricación de una vacuna que comprende mezclar una composición de adyuvante que es uno o más inmunoestimuladores adsorbidos sobre una partícula de metal con un antígeno. Preferentemente, el antígeno se ha adsorbido previamente sobre una sal metálica. Dicha sal metálica puede ser idéntica o similar a la sal metálica que se adsorbe sobre el inmunoestimulador. Preferentemente, la sal metálica es

5 una sal de aluminio, por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.
La presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende inmunoestimulador adsorbido sobre una primera partícula de una sal metálica, y antígeno adsorbido sobre una sal metálica, caracterizada por que la primera y segunda partículas de sal metálica son partículas separadas.

10 Algunos derivados de LPS o LOS o mutaciones o derivados del lípido A que se describen en el presente documento se diseñan para que sean menos tóxicos (por ejemplo, 3D-MPL) que los lipopolisacáridos nativos y son equivalentes que se pueden intercambiar con respecto a cualquier uso de estos restos que se describen en el presente documento. Estos pueden ser ligandos de TLR4 como se ha descrito anteriormente. Otros de los derivados mencionados se describen en los documentos de patente WO020786737, WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO03065806.

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

Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones de vacuna para individuos de edades avanzadas.

25 En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacárido derivados de al menos todos los serotipos siguientes: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (a y también puede comprender una o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en la que el título de anticuerpo de GMC inducido frente a uno o más (o todos) los componentes de la vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna de Plevnar® en vacunados humanos

30 En una realización, el ayudante usado para las composiciones de la invención comprende una emulsión de aceite en agua fabricada a partir de un aceite metabolizable (tal como escualeno), un agente emulgente (tal como Tween 80) y opcionalmente un tocol (tal como alfa tocoferol). En una realización, el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,5-15, 1-13, 2-11, 4-8, o 5-6 mg (por ejemplo, 2-3, 5-6, o 10-11 mg) de aceite metabolizable (tal como escualeno), 0,1-10, 0,3-8, 0,6-6, 0,9-5, 1-4, o 2-3 mg (por ejemplo, 0,9-1,1, 2-3 o 4-5 mg) de emulgente (tal como Tween 80) y 35 opcionalmente 0,5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 mg (por ejemplo, 11-13, 5-6, o 2-3 mg) de tocol (tal como alfa tocoferol).

Este adyuvante también puede comprender opcionalmente 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).

Estos adyuvantes son particularmente adecuados para formulaciones de vacuna para niños o individuos de edades avanzadas. En una realización, la formulación de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de 40 sacárido derivados de al menos todos los serotipos siguientes: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender una o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en la que el título de anticuerpo de GMC inducido frente a uno o más (o todos) los componentes de la vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna de Plevnar® en vacunados humanos.

45 Este adyuvante puede contener opcionalmente 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, o 0,125-0,25 mg (por ejemplo, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 o 0,125 µg) de estero (por ejemplo colesterol), 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL), y 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de saponina (por ejemplo QS21).

Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones de vacuna para individuos de edades avanzadas.

50 En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacárido derivados de al menos todos los serotipos siguientes: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también puede comprender una o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en la que el título de anticuerpo de GMC inducido frente a uno o más (o todos) los componentes de la vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna de Plevnar® en vacunados humanos.

55 En una realización, el adyuvante usado para las composiciones de la invención comprende fosfato de aluminio y un derivado del lípido A (tal como 3D-MPL). Este adyuvante puede comprender (por dosis de 0,5 ml) 100-750, 200-500, o 300-400 µg de Al como fosfato de aluminio, y que 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).

Este adyuvante es particularmente adecuado para las formulaciones de vacunas para sujetos con edades

avanzadas o infantiles. En una realización, la composición de vacuna que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacárido derivados de al menos todos los serotipos siguientes: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y también comprende uno o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en la que el título de anticuerpo de GMC inducido frente a uno o más (o todos) los componentes de la vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna de Prevnar® en vacunados humanos.

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar un mamífero susceptible a infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección mediante las vías intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), intradérmicas (ID) o subcutánea (SC); o mediante administración mucosal a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. La administración intranasal (IN) de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media es precedente (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos se puede prevenir de forma más eficaz, atenuando de este modo la infección en su estadio más temprano). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una sola dosis, algunos componentes de la misma también se pueden coadministrar en conjunto al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, algunos conjugados de sacárido de neumococos se podrían administrar por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para coordinación óptima de las respuestas inmunitarias entre sí). Para la coadministración, el adyuvante Th1 opcional puede estar presente en cualquiera o todas de las diferentes administraciones. Además de una sola vía de administración, se pueden usar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, se pueden administrar sacáridos o conjugados de sacárido IM (o ID) y algunas proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de sensibilización e IN para dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos de proteína en la vacuna por lo general estará en el intervalo de 1-100 µg, preferentemente 5-50 µg, por ejemplo en el intervalo de 5 - 25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos puedan recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas de forma adecuada.

Por lo general, la preparación de vacunas se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas se describe en Fullerton, documento de patente US 4.235.877.

Las vacunas de la presente invención se pueden almacenar en solución o se pueden liofilizar. Preferentemente, la solución se liofiliza en presencia de un azúcar tal como sacarosa o lactosa. Además, también es preferente que se liofilicen y se reconstituyan de forma extemporánea antes de su uso. La liofilización puede dar como resultado una composición más estable (vacuna) y posiblemente puede conducir a títulos de anticuerpos más elevados en presencia de 3D-MPL y en ausencia de un adyuvante basado en aluminio.

En un aspecto de la invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende adicionalmente un vial que contienen adyuvante como se describe en el presente documento. En este aspecto de la invención se prevé que el adyuvante se use para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Aunque las vacunas de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "rugosa" externa, denominada estrato córneo, que recubre la epidermis. Por debajo de esta epidermis se encuentra una capa denominada dermis, que a su vez recubre el tejido subcutáneo. Algunos investigadores han mostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular en la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, que también se puede asociar con una serie de ventajas adicionales. La vacuna intradérmica con las vacunas que se describen en el presente documento forma una característica preferente de la presente invención.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento de Mantoux", comprende las etapas de limpieza de la piel, y a continuación estirar con una mano, y con el cilindro de una aguja de calibre estrecho (calibre de 26-31) mirando hacia arriba, la aguja se inserta a un ángulo entre 10-15°. Una vez que el cilindro de la aguja se inserta, el cilindro de la aguja se baja y se hace avanzar adicionalmente mientras que se proporciona una ligera presión para elevarlo por debajo de la piel. A continuación el líquido se inyecta muy lentamente formando de este modo una ampolla o protuberancia en la superficie de la piel, seguido de la retirada lenta de la aguja.

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

la piel (administración transdérmica o transcutánea en el documento de patente WO 98/20734; documento de patente WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención se van a administrar a la piel, o de forma más específica en la dermis, la vacuna se encuentra en un volumen de líquido bajo, en particular un volumen entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "administración intradérmica" se refiere a la administración de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no se colocará necesariamente de forma exclusiva en la dermis. La dermis es la capa en la piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm desde la superficie en la piel humana, pero existe una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del organismo. En general, se puede esperar el alcance de la dermis profundizando 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis se localiza entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y en la capa subcutánea por debajo de la misma. Dependiendo del modo de administración, la vacuna se puede localizar por último solapó principalmente dentro de la dermis, o por último se puede distribuir dentro de la epidermis y la dermis.

La presente invención también proporciona una vacuna mejorada para la prevención o mejora de la Otitis media causada por *Haemophilus influenzae* mediante la adición de proteínas de *Haemophilus influenzae*, por ejemplo proteína D en forma conjugada. Además, la presente invención también proporciona una vacuna mejorada para la prevención o mejora de infección por neumococos en niños (por ejemplo, Otitis media), dependiendo de la adición de una o dos proteínas de neumococos como proteína libre o conjugada a las composiciones de conjugado de *S. pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas libres de neumococos pueden ser iguales o diferentes a cualquier proteína de *S. pneumoniae* usada como proteína vehículo. En la combinación de vacuna también se puede incluir uno o más antígenos de *Moraxella catarrhalis* en una forma libre o conjugada. Por lo tanto, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar unas respuestas inmunitarias (protectora) frente a la Otitis media en niños.

En otra realización, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar unas respuestas inmunitarias (protectora) en niños (definidos como 0-2 años de edad en el contexto de la presente invención) mediante la administración de una cantidad segura y eficaz de la vacuna de la invención [una vacuna pediátrica]. Además, algunas realizaciones de la presente invención incluyen la provisión de las composiciones de conjugado de *S. pneumoniae* antigénico de la invención para uso en medicina y el uso de los conjugados de *S. pneumoniae* de la invención en la preparación de un medicamento para la prevención (o tratamiento) de la enfermedad por neumococos.

En otra realización, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuestas inmunitarias (protectora) en la población de edad más avanzada (en el contexto de la presente invención, se considera que un paciente tiene una edad avanzada si tiene 50 años de edad o una edad superior, por lo general aproximadamente 55 años y más generalmente aproximadamente 60 años) mediante la administración de la cándida segura y eficaz de la vacuna de la invención, preferentemente en conjunto con una o dos proteínas de *S. pneumoniae* presentes como proteína libre o conjugada, cuyas proteínas de *S. pneumoniae* libres pueden ser iguales o diferentes como cualquier proteína de *S. pneumoniae* usadas como proteínas vehículo.

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

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

Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección por *S. pneumoniae* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. En un aspecto adicional, la enfermedad es cualquiera o ambas de neumonía o enfermedad neumocócica invasiva (IPD) de seres humanos de edad avanzada, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de seres humanos de edad avanzada, meningitis y/o bacteremia de seres humanos infantiles, otitis media de seres humanos infantiles o neumonía y/o conjuntivitis de seres humanos infantiles.

En el presente documento, los inventores pretenden que los términos "que comprende", "comprender" y

"comprende" se puedan sustituir opcionalmente con las expresiones "que consiste en", "consiste en" y "consistir en", respectivamente, en cada caso. El presente documento con alguna realizaciones que se refieren a "composiciones de vacuna" de la invención también se pueden aplicar a realizaciones que se refieren a "composiciones inmunogénicas" de la invención, y viceversa.

- 5 Para que la presente invención se pueda entender mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solamente para fines de ilustración, y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1: EXPRESIÓN DE PROTEÍNA D

10 Proteína D de *Haemophilus influenzae*

Construcción genética para expresión de proteína D

Materiales de partida

El ADN que codifica la proteína D

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

El vector de expresión pMG1

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

La cepa AR58 de *E. coli*

- 25 La cepa de AR58 *E. coli* se generó mediante transducción de N99 con una reserva de fagos P1 cultivará previamente en un derivado de SA500 (galE::TN10, lambdaKil⁻ cl857 Δ H1). Las cepas de N99 y SA500 son cepas K12 de *E. coli* derivadas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de la Salud.

El vector de expresión pMG 1

- 30 Para la producción de proteína D, el ADN que codifican la proteína se ha clonado en el vector de expresión pMG 1. Este plásmido usa señales a partir del ADN del fago lambda para conducir la transición y traducción de genes ajenos insertados. El texto contiene el promotor PL, operador OL y dos sitios de uso (NutL y NutR) para aliviar los efectos de la polaridad transcripcional cuando se proporciona N proteína (Gross y col., 1985). Los vectores que contienen el promotor PL, se introducen en un hospedador lisogénico de *E. coli* para estabilizar el ADN plásmido. Las cepas de hospedador lisogénico contienen ADN de fago lambda defectuoso para la replicación, integrado en el genoma (Shatzman y col., 1983). El ADN del fago lambda cromosómico dirige la síntesis de la proteína represora cl que se une al represor OL del vector y evita la unión de la ARN polimerasa con el promotor PL y por lo tanto la transcripción del gen insertado. El gen cl de la cepa AR58 de expresión contiene un mutante sensible a la temperatura de modo que la transcripción dirigida por PL se puede regular mediante el desplazamiento de temperatura, es decir, un aumento en la temperatura del cultivo inactiva al represor y comienza la síntesis de la proteína ajena. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas ajenas especialmente de las que pueden ser tóxicas para la célula (Shimataka y Rosenberg, 1981).
- 40

La cepa AR58 de *E. coli*

- 45 La cepa de *E. coli* lisogénica para AR58 usada para la producción del vehículo de proteína D se puede derivar de la cepa patrón N99 de K12 de *E. coli* del NIH (F⁻ su⁻ galK2, lacZ⁻ thr⁻). Esta contiene un fago lambda lisogénico defectuoso (galE::TN10, lambdaKil⁻ cl857 Δ H1). El fenotipo Kil⁻ evita la retención de la síntesis macromolecular del hospedador. La mutación cl857 confiere una lesión sensible a la temperatura para el represor cl. La supresión de Δ H1 elimina el operón derecho del fago lambda y los sitios bio, uvr3, y chlA de los hospedadores. La cepa AR58 se generó mediante transducción de N99 con una reserva de fago P1 cultivada previamente en un derivado de SA500 (galE::TN10, lambdaKil⁻ cl857 Δ H1). La introducción del lisogén defectuoso en N99 se seleccionó con tetraciclina en virtud de la presencia de un transposón de TN10 que codifican resistencia a tetraciclina en el gen galE adyacente.

50 Preparación del vector pMGMDPPrD

El vector pMG 1 que contiene el gen que codifica la proteína S1 no estructural del virus Influenzae (pMGNSI) se usó

para fabricar pMGMDPPrD. El gen de la proteína D se amplificó mediante PCR a partir del vector pHIC348 (Janson y col., 1991 Infect. Immun. 59: 119-125) con cebadores de PCR que contienen los sitios de restricción NcoI y XbaI en los extremos en las posiciones 5' y 3', respectivamente. El fragmento de NcoI/XbaI se introdujo a continuación en pMGNS1 entre NcoI y XbaI creando de este modo una proteína de fusión que contiene los 81 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 seguido de la proteína PD. Este vector se etiquetó como pMGNS1PrD. Basándose en el constructo que se ha descrito anteriormente, se generó el constructo final para la expresión de la proteína D. Un fragmento de BamHI/BamHI se retiró de pMGNS1PrD. Esta hidrólisis de ADN retiró la región de codificación de NS1, excepto para los tres primeros restos N-terminales. Después de volver a unir el vector, se genera un gen que codifica una proteína de fusión con la secuencia que se muestra en el documento de patente WO 07/71711, ejemplo 1, página 44.

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

El constructo final pMG-MDPPrD se introdujo en la cepa hospedadora AR58 mediante choque térmico a 37 °C. Las bacterias que contienen plásmido se seleccionaron en presencia de Kanamicina. La presencia del inserto de ADN que codifica la proteína D se demostró por digestión de ADN de plásmido aislado con endonucleasas seleccionadas. La cepa de *E. coli* recombinantes se denomina ECD4. La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor P_L / operador O_L lambda. La cepa hospedadora AR58 contiene un gen *cl* sensible a la temperatura en el genoma que bloquea la expresión de P_L lambda a baja temperatura mediante su unión para O_L . una vez que la temperatura aumenta, *cl* se libera de O_L y la proteína D se expresa.

Preparación a pequeña escala

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

La extracción de células cosechadas y la purificación de la proteína D se realizó como sigue a continuación. El sedimento de cultivo celular congelado se descongela y se vuelve a suspender en una solución de alteración celular (tampón citrato a pH 6,0) hasta una DO_{650} final = 60. La suspensión se pasa dos veces a través de una homogeneizador a alta presión a $P = 1000$ bar. El homogéneo de cultivo celular se aclara mediante centrifugación y el resto celular se retira por filtración. En la primera etapa de purificación, el lisado filtrado se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Flujo Rápido de SP Sepharose). El PD se une a la matriz de gel mediante interacción iónica y se eluyendo mediante un aumento de la etapa de la resistencia iónica del tampón de elución.

En una segunda etapa de purificación, las impurezas se retienen en una matriz de intercambio aniónico (Flujo Rápido de Q Sepharose). PD no se une sobre el gel y se puede recoger en el flujo continuo.

En ambas etapas de cromatografía en columna, la recogida se controla mediante DO. El flujo a través de la cromatografía en columna de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra mediante ultrafiltración.

La proteína D que contiene fracción retenida por ultrafiltración se pasa finalmente a través de una membrana de 0,2 μm .

Preparación a gran escala

La extracción a partir de células cosechadas y la purificación de la proteína D se realizó como sigue a continuación. El caldo de cultivo cosechado se enfría y se pasa directamente dos veces a través de una homogeneizadora a alta presión para una presión de aproximadamente 800 bares. En la primera etapa de purificación, el homo cenado de cultivo celular se diluye y se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (perlas grandes de SP Sepharose). El PD se une a la matriz de gel mediante interacción iónica y se excluye mediante una etapa que aumenta la fuerza iónica del tampón de elución y se filtra.

En una segunda etapa de purificación, las impurezas se retienen en una matriz de intercambio aniónico (Flujo Rápido de Q Sepharose). El PD no se une sobre el gel y se puede recoger en el flujo continuo.

En ambas etapas de cromatografía en columna, la recogida se controla mediante DO. El flujo a través de la cromatografía en columna de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra y se diafiltra mediante ultrafiltración.

La proteína D que contiene la fracción retenida por ultrafiltración se pasa por último a través de la membrana de 0,2 μm .

Ejemplo 1b: EXPRESIÓN DE PhtD

La proteína PhtD es un miembro de la familia de proteína de tríada de histidina de neumococos (Pht) caracterizada por la presencia de tríadas de histidina (motivo HXXHXXH). La PhtD es una molécula de 838 aa y porta 5 tríadas de histidina (véase la SEC ID N°: 4 del documento de patente de WO00/37105 MedImmune para secuencia de aminoácidos y la SEC ID N°: 5 para secuencia de ADN). La PhtD también contiene una región rica en prolina en la parte media (posición de los aminoácidos 348-380). La PhtD tiene una secuencia señal N-terminal de 20 aa con un motivo LXXC.

Construeto genético

La secuencia genética de la proteína PhtD de MedImmune madura (del aa 21 al aa 838) se transfirió de forma recombinante a *E. coli* usando el vector pTCMP14 de las instalaciones que portan el promotor pL. La cepa hospedadora de *E. coli* es AR58, que porta el represor termosensible cl857, que permite la inducción por calor del promotor.

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

Purificación de PhtD

La purificación de PhtD se consigue como sigue a continuación:

- ☐ Crecimiento de células de *E. coli* en presencia de Kanamicina: crecimiento 30 horas a 30 °C y a continuación inducción durante 18 horas a 39,5 °C
- ☐ Descomposición de las células de *E. coli* a partir de cultivo completo a DO ± 115 en presencia de EDTA 5 mM y PMSF 2 mM como inhibidores de proteasa: Rannie, 2 pasajes, 1000 bares.
- ☐ Captura de antígeno y eliminación de residuos celulares con cromatografía Streamline Q XL en modo de lecho expandido a temperatura ambiente (20 °C); la columna se lava con NaCl 150 mM + Empigen al 0,25 % a pH 6,5 y se diluye con NaCl 400 mM + Empigen al 0,25 % en tampón de fosfato potásico 25 mM a pH 7,4.
- ☐ Filtración en cartucho Sartobran 150 (0,45 + 0,2 µm)
- ☐ Unión al antígeno con cromatografía Sepharose FF IMAC con quelación de Zn⁺⁺ a pH 7,4 en presencia de imidazol 5 mM a 4 °C; la columna se lava con Imidazol 5 mM y Empigen al 1 % y se eluye con imidazol 50 mM, ambos en campos de fosfato potásico 25 mM a pH 8,0.
- ☐ Cromatografía de intercambio aniónico débil en modo positivo sobre Fractogel EMD DEAE a pH 8,0 (fosfato potásico 25 mM) a 4 °C; la columna se lava con NaCl 140 mM y se eluye a NaCl 200 mM mientras que los agentes contaminantes (proteínas y ADN) permanecen adsorbidos en el intercambiador.
- ☐ Concentración y ultrafiltración con fosfato Na/K 2 mM a pH 7,15 sobre membrana de 50 kDa.
- ☐ Filtración con esterilización del volumen purificado en un cartucho de filtro Millipak-20 de 0,2 µm.

Ejemplo 1c: EXPRESIÓN DE NEUMOLISINA

Se fabricó neumolisina de neumococos y se detoxificó como se describe en el documento de patente WO2004/081515 y en el documento de patente WO2006/032499.

Ejemplo 2:

Preparación de conjugados

En la técnica se sabe bien cómo fabricar polisacáridos de neumococos purificados. Para los fines de estos ejemplos, los polisacáridos se fabricaron básicamente como se describe en el documento de patente EP072513 o en procedimientos estrechamente relacionados. Antes de la conjugación, los polisacáridos se pueden clasificar según el tamaño mediante microfluidización como se describe a continuación.

Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas para cada polisacárido. Estas se proporcionan en la Tabla 1. El polisacárido clasificados según el tamaño (excepto para PS5, 6B y 23F) se disolvió en NaCl 2 M, NaCl 0,2 M o en agua para inyección (WFI). La concentración óptima de polisacáridos se evaluó para todos los serotipos. Todos los serotipos excepto el serotipo 18C se conjugaron directamente con la proteína vehículo como se detalla a continuación. Se fabricaron dos conjugados alternativos del serotipo 22F; uno se conjugó directamente, otro a través de un engarce de ADH.

A partir de una solución de reserva de 100 mg/ml en acetonitrilo o una solución de acetonitrilo/agua al 50 %/50 %, se añadió CDAP (proporción de CDAP/PS de 0,5-1,5 mg/mg de PS) a la solución de polisacárido. 1,5 minutos más tarde, se añadió NaOH 0,2 M-0,3 M para obtener el pH específico de activación. La activación del polisacárido se realizó a este pH durante 3 minutos a 25 °C. La proteína purificada (proteína D, PhtD, neumolisina o DT) (la cantidad

depende de la proporción inicial de PS/proteína vehículo) se añadió al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento se realizó al pH específico durante hasta 2 horas (dependiendo del serotipo) con regulación del pH. Para desactivar los grupos de éster de cianato sin reaccionar, a continuación se añadió a la mezcla una solución de glicina 2 M. El pH se ajustó al pH de desactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a 25 °C y a continuación durante una noche a 2-8 °C con agitación lenta continua.

Preparación de 18C:

18C se unió a la proteína vehículo mediante un engarce - Dihidrazida de ácido adípico (ADH). El serotipo 18C del polisacárido se microfluidizó antes de la conjugación.

Derivatización de toxoide del tétanos con EDAC

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

Acoplamiento químico de TT_{AH} a PS 18C

Los detalles de los parámetros de conjugación se pueden encontrar en la Tabla 1. Se diluyeron 2 gramos de PS microfluidizado en la concentración definida en agua y se ajustó a NaCl 2 M mediante adición de NaCl en polvo. La solución de CDAP (100 mg/ml recién preparados en acetonitrilo/WFI a 50/50 en v/v) se añadió para alcanzar la proporción de CDAP/PS apropiada.

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

Después de 3 minutos, se añadió TT_{AH} derivatizado (20 mg/ml en NaCl 0,2 M) para alcanzar una proporción de TT_{AH}/PS de 2; el pH se reguló hasta el pH 9,0 de acoplamiento. La solución se dejó una hora con regulación del pH. Para la desactivación, se añadió una solución de glicina 2 M a la mezcla de PS/TT_{AH}/CDAP. El pH se ajustó al pH de desactivación (pH 9,0).

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

Conjugado de PS22F_{AH}-PhtD

En un segundo procedimiento de conjugación para este sacárido (siendo el primero el procedimiento de conjugación directa de PS22-PhtD que se muestra en la Tabla 1), 22F se unió a la proteína vehículo a través de un engarce - Dihidrazida de ácido adípico (ADH). El serotipo 22F del polisacáridos se microfluidizó antes de la conjugación.

Derivatización de 22F de PS

Se realizaron activación y acoplamiento a 25 °C con agitación continua en un baño de agua con la temperatura controlada.

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

La solución de CDAP (100 mg/ml recién preparados en acetonitrilo/WFI, 50/50) se añadió para alcanzar la proporción de CDAP/PS apropiada (1,5/1 en p/p).

El pH se elevó hasta el pH 9,00 ± 0,05 de activación mediante la adición de NaOH 0,5 M y se estabilizó a este pH hasta la adición de ADH.

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

El derivado de PS_{AH} se concentró y se diafiltró.

Acoplamiento

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

Antes de la elución en Sephacril S400HR, el conjugado se aclaró usando un filtro Minisart de 5 µm.

El conjugado resultante tiene una proporción de PhtD/PS final de 4/1 (p/p), un contenido de PS libre inferior a un 1 % una antigenicidad (α -PS/ α -PS) de un 36,3 % y una antigenicidad anti-PhtD de un 7,4 %. La proporción de proteínas y polisacárido se midió usando los procedimientos de Lowry y Resorcinol y la antigenicidad se determinó usando ELISA de sándwich.

5 Purificación de los conjugados:

Los conjugados se purificaron mediante filtración en gel usando una columna de filtración en gel Sephacril S400HR equilibrada con NaCl 0,15 M (S500HR para 18C) para retirar moléculas pequeñas (incluyendo DMAP) y PS sin conjugar y proteína. Basándose en los diferentes tamaños moleculares de los componentes de la reacción, los conjugados de PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-neumolisina o PS-DT se eluyen primero, seguido de PS libre, a continuación con PD libre o DT libre y por último DMAP y otras sales (NaCl, glicina). Las fracciones que contienen conjugados se detectan mediante UV_{280 nm}. Las fracciones se combinan de acuerdo con sus K_d, se filtran de forma estéril (0,22 μ m) y se almacenan a +2-8 °C. Las proporciones de PS/Proteína en las preparaciones de conjugado se determinaron.

15 Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de Proteína D/TT/DT/PhtP/Ply de PS *S. pneumoniae*

Cuando "µfluido" aparecen un encabezado de fila, éste indica que el sacárido se clasificó según el tamaño mediante microfluidización antes de conjugación. Los tamaños de los sacáridos después de microfluidización se proporcionan en la tabla 2.

20 **Tabla 1** Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de proteína D/TT/DT/PhtP/Ply de PS *S. pneumoniae*

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

Serotipo	9V µfluido	14 µfluido	18C µfluido	19A µfluido	19F µfluido	22F µfluido	23F µfluido
PS conc. (mg/ml)	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0	2,38
PS disolución	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 0,2 M	NaCl 2 M

(continuación)

Serotipo	9V μfluido	14 μfluido	18C μfluido	19A μfluido	19F μfluido	22F μfluido	23F μfluido
Proteína vehículo conc. (mg/ml)	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0 (Ply)	20,0 (DT)	10,0 (PhTD)	5,0

Proporción Inicial de proteína vehículo/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg PS)	0,50	0,75	0,75	1,5		1,5	1,5
pH_a = pH_c = pH_q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,5/9,0

Nota: pH_a.c.q corresponde al pH para activación, acoplamiento e inactivación, respectivamente

Caracterización:

- 5 Cada conjugado se caracterizó y satisfizo las especificaciones que se describen en la Tabla 2. El contenido de polisacárido (μg/ml) se midió con el ensayo de Resorcinol y el contenido de proteína (μg/ml) con el ensayo de Lowry. La proporción final de PS/PD (p/p) se determina mediante la proporción de las concentraciones.

Contenido de polisacárido libre (%):

- 10 El contenido de polisacárido libre de los conjugados mantenidos a 4 °C o almacenados 7 días a 37 °C se determinó en el sobrenadante obtenido después de incubación con anticuerpos de proteína vehículo α y sulfato de amonio saturado, seguido de una centrifugación.
Para la cuantificación de polisacárido libre en el sobrenadante se usó un ELISA de α-PS/α-PS. La ausencia de conjugado también se controló mediante un ELISA de proteína vehículo α/α-PS.

Antigenicidad:

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

Contenido de proteína libre (%):

- 20 La proteína vehículo sin conjugar se puede separar del conjugado durante la etapa de purificación. El contenido de proteína residual libre se determinó usando cromatografía de exclusión por tamaño (TSK 5000-PWXL) seguido de detección de UV (214 nm). Las condiciones de elución permitieron la separación de la proteína vehículo libre y del conjugado. El contenido de proteína libre en los volúmenes de conjugado se determinó a continuación con respecto a la curva de calibración (de 0 a 50 μg/ml de proteína vehículo). La proteína vehículo libre en % se obtuvo como sigue a continuación: % de vehículo libre = (vehículo libre (μg/ml)/ (Concentración total de proteína vehículo correspondiente medida con Lowry (μg/ml) * 100 %).

Estabilidad:

- 30 La distribución del peso molecular (K_{av}) y la estabilidad se midieron con una HPLC-SEC con filtración en gel (TSK 5000-PWXL) para los conjugados mantenidos a 4 °C y almacenados durante 7 días a 37 °C.
La caracterización 10/11/13/14-valente se proporciona en la Tabla 2 (véase comentario en virtud de la misma).
Los conjugados de proteína se pueden adsorber en fosfato de aluminio y se pueden combinar para formar la vacuna final.

TABLA 2 – características de los conjugados

Conjugados	Tamaño de PS (Da x 10 ³)	Proporción de Vehículo/PS	PS Libre (Elisa)	Vehículo Libre	Antigenicidad de PS (Elisa)	Tamaño del Conj. (kDa)
PS1-PD	349-382*	1,5-1,6	1,0 %-1,2 %	3,9 %-4,8 %	87 %-95 %	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1,5-1,6	4,7-6,5 %	3,2 %-4,0 %	90 %-96 %	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0,80	8,7-11,2 %	2,2 %-3,8 %	93 %-108 %	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0,61	4,5 %	ND	45,9 %	ND
PS6B-PD***	1069-1391	0,7-0,8	1,3-1,6 %	< 2,0 %	68 %-75 %	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1,1-1,2	< 1 %	< 1,4 %	58 %	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1,3-1,5	< 1 %	< 1,3 %	67 %-69 %	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1,4	< 1 %	< 1,5 %	70 %	3430-3779
PS18C-TT	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2 %	< 4 %	46 %-56 %	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3,2	< 1 %		29 %	
PS19F-DT	133-143*	1,4-1,5	4,1 %-5,9 %	< 1,2 %-< 1,3 %	82 %-88 %	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2,17	5,8	ND	37 %	ND
PS22F-AHPhtD*	159-167	3,66-4,34	< 1 %	ND	28-31 %	ND
PS23F-PD***	914-980	0,5	1,4-1,9 %	3,7 %-4,9 %	137 %-154 %	2933-3152
* tamaño de PS después de microfluidización del PS nativo *** polisacárido con tamaño sin ajustar ND - no determinado						

Una vacuna 10 valente se fabricó mezclando conjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (por ejemplo, a una dosis de 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 µg de sacárido, respectivamente por dosis humana). Una vacuna 11 valente se fabricó mediante la adición adicional del conjugado de serotipo 3 de la Tabla 5 (por ejemplo, a un microgramo de sacárido por dosis humana). Una vacuna 13 valente se fabricó mediante la adición adicional de conjugados de los serotipos 19A y 22F mencionados anteriormente (con 22F unido directamente a PhtD, o como alternativa a través de un engarce ADH) [por ejemplo a una dosis de 3 µg de cada sacárido por dosis humana]. Una vacuna 14 valente se puede fabricar mediante la adición de conjugado del serotipo 6A mencionado anteriormente [por ejemplo a una dosis de 1 µg de sacárido por dosis humana].

Ejemplo 3: Evidencia de que la inclusión de proteína D de *Haemphilus influenzae* en una composición inmunogénica de la invención puede proporcionar aumento de la protección frente a otitis media aguda (AOM).

Diseño del estudio.

El estudio usado en una vacuna de 11Pn-PD - que comprende los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F cada uno conjugado con protein D de *H. influenzae* (hacer referencia a la Tabla 5 en el Ejemplo 4). Los sujetos se clasificaron al azar en dos grupos para recibir cuatro dosis de cualquiera de la vacuna de 11Pn-PD o *Havrix* a aproximadamente 3, 4, 5 y 12-15 meses de edad. Todos los sujetos recibieron la vacuna *Infanrix- hexa* (DTPa-HBV-IPV/Hib) de GSK Biologicals de forma simultánea a los 3, 4 y 5 meses de edad. *Infanrix- hexa* es una combinación de *Pediarix*, y Hib mezclados antes de la administración. El seguimiento de la eficacia para el análisis "De acuerdo con el Protocolo" comenzó a las 2 semanas después de la administración de la tercera dosis de vacuna y continuó hasta los 24-27 meses de edad. El transporte en nasofaringeo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* se evaluó en un subconjunto seleccionado de sujetos. Se avisó a los padres que consultarán al investigador si su hijo estaba enfermo, tenía dolor de oídos, perforación espontánea de la membrana timpánica o secreción auricular espontánea. Si el investigador sospechaba de un episodio de AOM, el niño se derivaba inmediatamente a un especialista en Oído, Nariz y Garganta (ENT) para confirmación del diagnóstico. Un diagnóstico clínico de AOM ya sea en el aspecto visual de la membrana timpánica (es decir, enrojecimiento, inflamación, pérdida de reflejo ligero) o la presencia de efusión de fluido del oído medio (como se demuestra mediante otoscopia simple o neumática o con microscopio). Además, al menos dos de los siguientes signos o síntomas tenían que estar presentes, dolor de oído, secreción auricular, pérdida de audición, fiebre, letargia, irritabilidad, anorexia, vómitos o diarrea. Si el especialista en ENT confirmaba el diagnóstico clínico, se recogía una muestra de ensayo de fluido del oído medio mediante timpanocentesis para ensayo bacteriológico. Para los sujetos con visitas por malestar en repetidas, se consideraba

que un nuevo episodio de AOM había comenzado si habían transcurrido más de 30 días desde el comienzo del episodio anterior. Además, se consideraba que un episodio de AOM era un nuevo episodio bacteriano y la bacteria/serotipo aislado difería del aislado anterior fuera cual fuera el intervalo entre los dos episodios consecutivos.

Resultados del ensayo

- 5 Se inscribieron un total de 4968 niños, 2489 en el grupo de 11Pn-PD y 2479 en el grupo de control. No se produjeron diferencias importantes en las características demográficas o factores de riesgo entre los dos grupos.

Episodios clínicos y definición del caso de AOM

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

- 10 La Tabla 3 presenta la eficacia protectora de la vacuna de 11 Pn-PD y ambas vacunas 7-valente sometidas a ensayo anteriormente en Finlandia (Eskola y col., N Engl J Med 2001; 344: 403 - 409 y Kilpi y col., Clin Infect Dis 2003 37: 1155-64) frente a cualquier episodio de AOM y AOM causada por serotipos de neumococos diferentes, *H. influenzae*, *NTHi* y *M. catarrhalis*. Se consiguió una reducción estadísticamente significativa y clínicamente relevante en un 33,6 % de la carga global de enfermedad por AOM con 11 Pn-PD, independientemente de la etiología (tabla 3).

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

- 20 Otro hallazgo importante en el estudio actual es la protección de un 35,6 % proporcionada por la vacuna de 11Pn-PD frente a AOM causada por *H. influenzae* (y específicamente una protección de un 35,3 % proporcionada por NTHi). Este hallazgo tiene una importancia clínica importante, dado el aumento de importancia de *H. influenzae* como una causa principal de AOM en la época de vacuna de conjugado de neumococos. En línea con la protección proporcionada frente a AOM, la vacuna de 11Pn-PD también reducía al transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* después de la dosis de refuerzo en el segundo año de vida. Estos hallazgos están en contraste con las observaciones previas en Finlandia lugar en el que se observó, para ambas vacunas que conjugado de neumococos 7-valente, un aumento de dos episodios de AOM debido a *H. influenzae*, (Eskola y col., y Kilpi y col.) como evidencia de la sustitución etiológica.

- 30 No se pudo establecer una correlación clara entre protección frente a episodios de AOM debido a niveles de Hi y anticuerpo frente a la Proteína D vehículo, dado que las concentraciones de anticuerpo de IgG anti-PD post-primarias en vacunados con 11Pn-PD, que permanecían libres de episodio de AOM por Hi, eran básicamente las mismas que las de los niveles de anticuerpo de IgG anti-PD post-primario medidos en vacunas 11Pn-PD que desarrollaron al menos un episodio de AOM por Hi durante el periodo de seguimiento de la eficacia. Sin embargo, aunque no se pudo establecer una correlación entre el impacto biológico de la vacuna y la inmunogenicidad anti-PD de IgG post-primaria, es razonable suponer que la proteína vehículo de PD, que está altamente conservada entre cepas de *H. influenzae*, ha contribuido en gran medida en la inducción de la protección frente a Hi.

- 35 El efecto en la enfermedad por AOM iba acompañado de un efecto en el transporte nasofaríngeo que tenía una magnitud similar para neumococos de serotipo de vacuna y *H. influenzae* (Figura 1). Esta reducción del transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* en las vacunas de conjugado de PD apoya la hipótesis de un efecto protector de la vacuna de conjugado de PD frente a *H. influenzae*, incluso si la eficacia protectora no se podía correlacionar con las respuestas inmunitarias de IgG anti-PD tal como se mide con ELISA.

- 40 En un experimento posterior, se usó un modelo de otitis media de chinchilla con combinaciones de suero de niños inmunizados con la formulación 11 valente de este ejemplo o con la vacuna 10 valente del Ejemplo 2 (véase también la Tabla 1 y 2 y comentarios en virtud de la misma). Ambas combinaciones inducen una reducción significativa del porcentaje de animales con otitis media con respecto a la combinación de suero pre-inmunitario. No se produce una diferencia significativa entre las combinaciones inmunitarias 10 y 11 valente. Esto demuestra que ambas vacunas tienen un potencial similar para inducir protección frente a la otitis media causada por *H. influenzae* no tipificable en este modelo.

Tabla 3

Tipo de episodios de AOM	11 Pn-PD						Prevna en FinOM (Enola y col.)						7v-OMP en FinOM (Klip y col.)					
	n			VE			n			VE			n			VE		
	11Pn-PD	Control	%	LL	UL	95 % de CI	7v-CRM	Control	%	LL	UL	95 % de CI	7v-OMP	Control	%	LL	UL	95 % de CI
N	2455	2452					786	794					805	794				
Cualquier AOM	333	499	33,6	20,8	44,3		1251	1345	6	-4	16		1364	1345	-1	-12	10	
Cualquier AOM con MEF	322	474	32,4	19,0	43,6		1177	1267	7	-5	17		1279	1267	0	-12	10	
Neumococo confirmado con cultivo	92	189	51,5	36,8	62,9		271	414	34	21	45		314	414	25	11	37	
Serotipos de neumococo para vacuna (*)	60	141	57,6	41,4	69,3		107	250	57	44	67		110	250	56	44	66	
Otros patógenos bacterianos																		
<i>H. influenzae</i>	44	68	35,6	3,8	57,0		315	287	-11	-34	8		315	287	-9	-32	10	
<i>H. influenzae</i> no tipificable (NTHi)	41	63	35,3	1,8	57,4		NP	NP	NP	NP	NP		NP	NP	NP	NP	NP	
<i>M. catarrhalis</i>	31	34	9,4	-52,5	46,1		379	381	-1	-19	15		444	381	,16	-36	2	

NP = No publicado; N = número de sujetos en población base de eficacia de ATP; n = número de episodios
 *Serotipos de pneumococos para vacuna: para 11 Pn-PD = 11 serotipos, para Prevna y 7v-OMP = 7 serotipos
 MEF = Fluido del oído medio

Ejemplo 4:**Selección de proteína vehículo para el serotipo 19F****Ensayo de ELISA usado**

El procedimiento de ELISA para inhibición de 22F se basaba básicamente en un ensayo propuesto en 2001 por Concepcion y Frasch y se informaba en Henckaerts y col., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 356-360. En resumen, se mezclaron polisacáridos de neumococos purificados con albúmina de suero humano metilada y se adsorbieron en placas de microtitulación de unión elevada Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) durante una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con suero bovino fetal al 10 % (FBS) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las muestras de suero se diluyeron en FBS al 10 % que contenía PBS, 10 µg/ml de polisacárido de pared celular (SSI) y 2 µg/ml de polisacárido de neumococos del serotipo 22F (ATCC), y se diluyeron adicionalmente en las placas de microtitulación con el mismo tampón. Una referencia interna calibrada frente al suero patrón 89-SF usando las concentraciones de IgG específicas del serotipo en 89-SF se trató de la misma manera se incluyó en cada placa. Después del lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpo monoclonal de IgG anti-humana conjugada con peroxidasa (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) diluido en FBS al 10 % (en PBS), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El color se desarrolló usando un kit de sustrato de inmunoensayo enzimático con tetrametilbenzidina para peroxidasa de un solo componente listo para usar (BioRad, Hercules, CA, US) en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0,18 M, y la densidad óptica se leyó a 450 nm. Las concentraciones de IgG específicas del serotipo (en µg/ml) en las muestras se calcularon por referencia a los puntos de densidad óptica dentro de los límites definidos con respecto a la curva de suero de referencia interna, con la que se formó modelo para una ecuación log logística de 4 parámetros calculada con el software SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El punto de corte para el ELISA fue 0,05 µg/ml de IgG para todos los serotipos teniendo en cuenta el límite de detección y el límite de cuantificación.

Ensayo de opsonofagocitosis

En la reunión de consulta de la OMS en junio de 2003, se recomendó el uso de un ensayo de OPA tal como se establece en Romero-Steiner y col., *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 10 (6): pp 1019-1024. Este protocolo se usó para someter al ensayo la actividad de OPA de los serotipos en los ensayos que siguen a continuación.

Preparación de conjugados

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

Las respuestas de anticuerpo anti-neumococos y actividad de OPA frente al serotipo 19F un mes después de la primera vacunación con estas formulaciones de 19F-DT se muestran en la Tabla 8 y 9 respectivamente. La Tabla 10 muestra concentraciones de anticuerpo 22F-ELISA y porcentajes de sujetos que alcanzan el umbral de 0,2 µg/ml antes y después de la vacunación de refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente.

Se mostró que la actividad opsonofagocítica aumentaba claramente para anticuerpos inducidos con estas formulaciones de 19F-DT tal como se demuestra mediante las tasas de seropositividad más elevadas (titulaciones opsonofagocíticas ≥ 1:8) y los GMT de OPA un mes después de la primera vacunación (Tabla 9). Un mes después de la vacunación de refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente, la actividad opsonofagocítica de anticuerpos 19F permanecía significativamente mejor para niños estimulados con formulaciones de 19F-DT (Tabla 11).

La Tabla 12 presenta datos de inmunogenicidad después de una dosis de refuerzo de 11Pn-PD en niños con edad de empezar a caminar estimulados con conjugados de 19F-DT o 19F-PD en comparación con una 4ª dosis consecutiva de *Prevnam*®. Dados los casos de avances importantes informados después de la introducción de *Prevnam*® en Estados Unidos, el aumento de la actividad opsonofagocítica frente al serotipo 19F cuando se conjugaba con la proteína vehículo de DT puede ser una ventaja para la vacuna candidata.

La Tabla 13 proporciona datos de ELISA y OPA para el conjugado de 19F-DT con respecto al serotipo 19A de reactividad cruzada. Se encontró que 19F-DT induce una actividad de OPA baja pero significativa frente a 19A.

Tabla 4 Formulaciones de vacuna de conjugado de neumococos usadas en estudios clínicos.

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

(continuación)

Formulación	µg/proteína vehículo de serotipo de neumococos											mg de Al ³⁺
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
Forma 2 de 19F-DT	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35
Forma 3 de 19F-DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	3/PD	= 0,5

Tabla 5 Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de D/TT/DT de Proteína de *S. Pneumoniae* de PS

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

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

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

Serotipo	1 µfluido	3 µfluido	4 µfluido	5 µfluido	6B µfluido	7F Nativo
conc. de PS (mg/ml)	4	2,0	2,5	7,5	10	3,0

disolución de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
conc. de PD (mg/ml)	10,0	5,0	5,0	5,0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5,0
Proporción Inicial de PD/PS (p/p)	1,2/1	1/1	1/1	1/1	1,5/1	1/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	1,50	0,75	1,5	2	1,5	0,75
pH _a = pH _c = pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9/9/9
Tiempo de acoplamiento	60 mins	60 mins	60 mins	60 mins	60 mins	60 mins

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

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

Serotipo	1 Nativo	3 µfluido	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F µfluido
conc. de PS (mg/ml)	1,5	2,0	2	7,5	5,5	5,0
disolución de PS	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
conc. de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5	10
Proporción Inicial de PD/PS (p/p)	0,7/1	1/1	1	1/1	1/1	1,2/1
conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75

pH _a = pH _c = pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5,9,5/9
Tiempo de acoplamiento	60 mins	60 mins	45 mins	40 mins	60 mins	60 mins

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

Tabla 8 Porcentaje de sujetos con concentración de anticuerpo 19F $\geq 0,20$ $\mu\text{g/ml}$ y concentraciones medias geométricas de anticuerpo 19F (GMC con un 95 % de CI; $\mu\text{g/ml}$) un mes después de la primera vacunación con 1 μg de 19F-PD, 3 μg de 19F-DT o *Prevnam* (2 μg de 19F-CRM) (Población base total)

Grupo	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% $\geq 0,20$ $\mu\text{g/ml}$ (95 % de CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95 % de CI)	N	% $\geq 0,20$ $\mu\text{g/ml}$ (95 % de CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95 % de CI)
11Pn-PD	152	98,7 (95,3-99,8)	1,93 (1,67-2,22)	50	100 (92,9-100)	2,78 (2,31-3,36)
Forma 1 ^r de 19F-DT	146	99,3 (96,2-100)	2,88 (2,45-3,38)	-	-	-
Forma 2 ^r de 19F-DT	150	96,0 (91,5-98,5)	2,43 (2,01-2,94)	-	-	-
Forma 3 ^r de 19F-DT	-	-	-	50	96,0 (86,3-99,5)	3,70 (2,58-5,30)
<i>Prevnam</i>	148	98,6 (95,2-99,8)	2,98 (2,60-3,41)	41	97,6 (87,1-99,9)	2,91 (2,15-3,94)

¹ La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

5 Tabla 9 Porcentaje de sujetos con titulación de 19F OPA $\geq 1:8$ y los GMT de 19F OPA un mes después de la primera vacunación con 1 μg de 19F-PD, 3 μg de 19F-DT o *Prevnam* (2 μg de 19F-CRM) (Población base total)

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

¹ La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

10 Tabla 10 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpo 19F $\geq 0,20$ $\mu\text{g/ml}$ y GMC de anticuerpo 19F ($\mu\text{g/ml}$) antes de y un mes después refuerzo con polisacárido sencillo 23-valente en niños sensibilizados con 1 μg de 19F-PD, 3 μg de 19F-DT o *Prevnam* (2 μg de 19F-CRM) (Población base total)

Grupo principal	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	Antes de la vacunación de refuerzo			Un mes después de la estimulación con 23-valente		
	N	% $\geq 0,20$ $\mu\text{g/ml}$ (95 % de CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95 % de CI)	N	% $\geq 0,20$ $\mu\text{g/ml}$ (95 % de CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95 % de CI)
11Pn-PD	70	77,1 (65,6-86,3)	0,67 (0,45-0,98)	67	94,0 (85,4-98,3)	11,50 (7,76-17,03)

(continuación)

Grupo principal	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	Antes de la vacunación de refuerzo			Un mes después de la estimulación con 23-valente		
Forma 1 ^f de 19F-DT	68	91,2 (81,8-96,7)	0,71 (0,54-0,94)	69	98,6 (92,2-100)	14,50 (10,47-20,07)
Forma 2 ^f de 19F-DT	74	81,1 (70,3-89,3)	0,59 (0,43-0,80)	72	95,8 (88,3-99,1)	9,90 (6,74-14,54)
<i>Prevnam</i>	65	64,6 (51,8-76,1)	0,40 (0,27-0,60)	67	100 (94,6-100)	9,40 (6,95-12,71)

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

Tabla 11 Porcentaje de sujetos con titulación de 19F OPA $\geq 1:8$ y GMT de 19F OPA antes de y un mes después de estimulación de polisacárido sencillo 23-valente en niños sensibilizados con 1 μ g de 19F-PD, 3 μ g de 19F-DT o *Prevnam* (2 μ g de 19F-CRM) (Población base total)

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

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

Tabla 12 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpo $\geq 0,2$ μ g/ml, OPA $\geq 1:8$ y GMC/GMT frente a neumococos 19F un mes después del refuerzo con 11Pn-PD o *Prevnam* en niños sensibilizados con 1 μ g de 19F-PD, 3 μ g de 19F-DT o *Prevnam* (2 μ g de 19F-CRM) (Población base total)

Grupo principal	11Pn-PD&Di-002					
	ensayo de 22F-ELISA			ensayo de OPA		
	N	% $\geq 0,20$ μ g/ml (95 % de CI)	GMC (μ g/ml) (95 % de CI)	N	% $\geq 1:8$ (95 % de CI)	GMT (95 % de CI)
11Pn-PD	70	100 (94,9-100)	4,52 (3,7-5,5)	21	100 (83,9-100)	255,6 (135,5-481,9)
Forma 1 ^f de 19F-DT	66	98,5 (91,8-100)	3,45 (2,8-4,3)	23	95,7 (78,1-99,9)	374,0 (192,6-726,2)
Forma 2 ^f de 19F-DT	70	98,6 (92,3-100)	3,80 (2,9-4,9)	29	96,6 (82,2-99,9)	249,1 (144,7-428,7)

(continuación)

Grupo principal	11Pn-PD&Di-002					
	ensayo de 22F-ELISA			ensayo de OPA		
	N	% ≥ 0,20 µg/ml (95 % de CI)	GMC (µg/ml) (95 % de CI)	N	% ≥ 1:8 (95 % de CI)	GMT (95 % de CI)
<i>Pprevnar</i>	69	97,1 (89,9-99,6)	2,56 (2,0-3,3)	31	96,8 (83,3-99,9)	528,7 (319,4-875,2)
¹ La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.						

Tabla 13 Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpo ≥ 0,2 µg/ml, OPA ≥ 1:8 y GMC/GMT frente a neumococos 19A un mes después de la primera vacunación con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o *Pprevnar* (2 µg de 19F-CRM) (Población base total)

Grupo	11Pn-PD&Di-001					
	ensayo de 22F-ELISA			ensayo de OPA		
	N	% ≥ 0,20 µg/ml (95 % CI)	GMC (µg/ml) (95 % de CI)	N	% ≥ 1:8 (95 % de CI)	GMT (95 % de CI)
11Pn-PD	45	28,9 (16,4-44,3)	0,09 (0,07-0,11)	52	7,7 (2,1-18,5)	5,2 (4,0-6,8)
Forma 2 ^r de 19F-DT	51	29,4 (17,5-43,8)	0,11 (0,08-0,16)	59	27,1 (16,4-40,3)	12,4 (7,6-20,3)
<i>Pprevnar</i>	55	18,2 (9,1-30,9)	0,10 (0,08-0,12)	61	3,3 (0,4-11,3)	4,6 (3,8-5,6)
¹ La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4						

Ejemplo 5: Experimentos con adyuvante en modelos preclínicos: impacto en la inmunogenicidad de conjugados de polisacárido 11-valente de neumococos en monos Rhesus de edad más avanzada

Para optimizar la respuesta obtenida para conjugar vacunas de neumococos en la población de edad más avanzada, GSK formuló una vacuna de conjugado de polisacárido (PS) 11-valente con un nuevo adyuvante, el Adyuvante C - véase a continuación.

Se inmunizaron grupos de 5 monos Rhesus de edad más avanzada (de 14 a 28 años de edad) por vía intramuscular (IM) los días 0 y 28 con 500 µl de cualquier conjugado de PS 11-valente adsorbido sobre 315 µg de AlPO₄ o conjugados de PS 11-valente mezclados con Adyuvante C.

En ambas formulaciones de vacuna, cada uno de los conjugados de PS 11-valente estará formado por los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT y PS6B-DT. La vacuna usada era 1/5 de dosis de la dosis humana de la vacuna (5 µg de cada sacárido por dosis humana excepto para 6B [10 µg]) conjugada de acuerdo con las condiciones de la Tabla 6 (Ejemplo 4), excepto 19F que se fabricó de acuerdo con las siguientes condiciones del procedimiento de CDAP: sacárido medido a 9 mg/ml, PD a 5 mg/ml, una proporción de PD/PS inicial de 1,2/1, una concentración de CDAP de 0,75 mg/mg de PS, pH_a = pH_c = 9,0/9,0/9,0 y un tiempo de acoplamiento de 60 min.

Los niveles de IgG de ELISA anti-PS y las titulaciones de opsonofagocitosis se dosificaron en sueros recogidos el día 42. Las frecuencias de linfocitos B de memoria anti-PS3 se midieron con Elispot de células de sangre periférica recogidas el día 42.

De acuerdo con los resultados que se muestran aquí a continuación, el Adyuvante C aumentó de forma significativa la inmunogenicidad de los conjugados de PS 11-valente con respecto a conjugados con AlPO₄ en monos de edad más avanzada. El nuevo adyuvante aumentó las respuestas de IgG a PS (Figura 1) y las titulaciones de anticuerpo opsonofagocitosis (Tabla 14). También había una evidencia de apoyo de que la frecuencia de los linfocitos B de memoria específicos de PS3 aumentar con el uso de Adyuvante C (Figura 2).

Tabla 14, Inmunogenicidad conjugada en monos Rhesus adultos (titulaciones de opsono-fagocitosis post-II)

	PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
AIPO4 11-valente	Pre-immune día 14 post II	< 8 8	5 181	< 8 64	5 49	< 8 64	16 4096	< 8 42	< 8 169	< 8 64	< 8 64
AdJ-C 11 valente	Pre-immune día 14 post II	5 776	9 1351	< 8 891	5 676	8 6208	37 16384	< 8 111	< 8 7132	< 8 2048	< 8 64

Elispot de Linfocitos B

El principio del ensayo depende del hecho de que los linfocitos B de memoria maduran en células de plasma *in vitro* después del cultivo con CpG durante 5 días. Las células de plasma específicas de antígeno generadas *in vitro* se pueden detectar fácilmente y por lo tanto se pueden enumerar usando el ensayo Elispot de linfocitos B. El número de células de plasma específicas refleja la frecuencia de linfocitos B de memoria al comienzo del cultivo.

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

En el presente estudio, se han usado polisacáridos para revestir placas de cultivo con el fin de enumerar los respectivos linfocitos B de memoria. Los resultados se expresan como una frecuencia de linfocitos B de memoria específicos de PS dentro de un millón de linfocitos B de memoria.

El estudio muestra que el Adyuvante C puede ser capaz de aliviar el problema conocido de la estabilidad del refuerzo de PS3 (véase el 5º International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, 2-6 de abril de 2006, Alice Springs, Central Australia. Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p 245, PO10.06).

Ejemplo 6, Eficacia de Neumolisina detoxificada (dPly) como una proteína vehículo para aumentar la inmunogenicidad de PS 19F en ratones Balb/c jóvenes

Se inmunizaron grupos de 40 ratones Balb/c hembra (4 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de cualquiera de PS sencillo 4-valente o PS conjugado con dPly 4-valente, ambos mezclados con el Adyuvante C.

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

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

La respuesta anti-PS19F, mostrada como un ejemplo en la Figura 3, estaba fuertemente aumentada en ratones administrados con conjugados de dPly 4-valente en comparación con ratones inmunizados con el PS sencillo. El mismo aumento se observó para las respuestas de IgG anti-PS8, 12F y 22F (los datos no se muestran).

Ejemplo 7, Eficacia de Proteína D de Triada de Histidina de Neumococos (PhtD) como una proteína vehículo para aumentar la inmunogenicidad de PS 22F en ratones Balb/c jóvenes

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

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

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

La respuesta anti-PS22F, mostrada como un ejemplo en la Figura 4, estaba fuertemente aumentada en ratones administrados con conjugados de PhtD 4-valente en comparación con ratones inmunizados con el PS sencillo. El mismo aumento se observó para las respuestas de IgG anti-PS8, 12F y 19F (los datos no se muestran).

Ejemplo 8, Inmunogenicidad en ratones C57BI de edad más avanzada de conjugados de PS 13-valente que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD

Se inmunizaron grupos de 30 C57BI ratones de edad avanzada (> 69 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de cualquier conjugado de PS 11-valente o conjugados de PS 13-valente, ambos mezclados con el Adyuvante C (véase a continuación).

La formación de vacuna 11-valente estaba formada por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 11 valente que se discute en la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente además contenía 0,1 µg de conjugados de PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 13 valente que se discute en la Tabla 2 [que usa 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4 el vehículo de neumolisina estaba detoxificado con tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se realizó con formaldehído (los procedimientos se describen en el documento del patente WO 04/81515). En los grupos 2 y 3 se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los grupos 4 y 5 se usó una fusión de PhtD_E (el constructo VP147 del documento de patente WO 03/054007). En el grupo 6, 19A se conjugó con toxoide de difteria y 22F a la proteína D.

Los niveles de IgG de ELISA de anti-PS19A y 22F se evaluaron en sueros individuales recogidos el día 42 usando el siguiente procedimiento. La respuesta de IgG con ELISA generada para el otro PS se midió en sueros combinados.

Procedimientos de serología de ratón:

Los niveles de IgG de ELISA anti-PS19A se evaluaron en sueros recogidos el día 42 usando el procedimiento que se describe aquí a continuación:

Las microplacas se revistieron durante 2 horas a 37 °C con 19A de tipo PS de neumococos purificado (10 µg/ml) en tampón de PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM - Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (V/V) en PBS al 0,05 % Tween 20. Los sueros se añadieron a los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de dos veces) en PBS-BSA al 0,05 % Tween al 0,05 %.

5 Las placas se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como se ha mencionado anteriormente y se añadió un conjugado de IgG- peroxidasa anti-ratón (diluido a 1/2500) y las placas se incubaron durante 30 minutos a TA. Después de lavado, el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M a pH 4,5 y 5 µl de H₂O₂) se añadió a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N. La absorbancia se leyó a 490-620 nm usando un espectrofotómetro. El color desarrollado es directamente

10 proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

El nivel de la IgG anti-PS19A presente en las muestras de sueros se determina por comparación con la curva de referencia y se expresa en µg/ml. Se generó una curva de referencia para cada placa a partir de resultados de ELISA para cantidad conocida de suero añadido.

15 Los niveles de IgG con ELISA anti-PS22F se evaluaron en sueros recogidos el día 42 usando el procedimiento que se describe aquí a continuación:

Las microplacas se revistieron durante 2 horas a 37 °C con 22F de tipo PS de neumococos purificado (10 µg/ml) en tampón de PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM - Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (V/V) en PBS 0,05 % Tween 20. Los sueros se añadieron a los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de dos veces) en PBS-BSA al 0,05 % Tween al 0,05 %.

20 Las placas se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como se ha mencionado anteriormente y se añadió un conjugado de peroxidasa con anticuerpos de IgG anti-ratón (diluido a 1/2500) y las placas se incubaron durante 30 minutos a TA. Después de lavado, el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M a pH 4,5 y 5 µl de H₂O₂) se añadió a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N. La absorbancia se leyó a 490-620 nm usando un espectrofotómetro. El color

25 desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

El nivel de la IgG anti-PS22F presente en los sueros desconocidos se determina por comparación con el suero de la curva de referencia añadido en cada placa y se expresa en µg/ml.

Las respuestas inmunitarias dirigidas frente a todos los otros serotipos se realizaron de acuerdo con los mismos procedimientos excepto en que se combinaron los sueros de ratones.

30 Se mostró que 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna de conjugado 13-valente eran inmunogénicos en ratones C57Bl de edad avanzada (Tabla 15). La respuesta inmunitaria inducida frente al otro PS no presentaba impacto de forma negativa en ratones a los que se proporciona la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Tabla 15, Inmunogenicidad de PS en ratones C57Bl de edad avanzada (niveles de IgG post-III)

Ratones C57 de color negro de edad avanzada						
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C
1 Combinación media	19,30	20,20	24,40	12,80	12,10	13,60
3 Combinación media	6,32	4,84	5,21	6,74	2,38	2,54
4 Combinación media	60,9	67,1	51,4	47,4	45,5	41,1
5 Combinación media	1,34	3,81	3,06	2,75	1,26	1,23

(continuación)

Ratones C57 de color negro de edad avanzada						
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C
6B Combinación media	4,41	4,12	5,88	1,58	2,31	5,64
7F Combinación media	0,83	0,81	1,65	1,98	0,89	0,99
9V Combinación media	13,8	23,7	20,0	13,1	15,5	9,6
14 Combinación media	25,73	42,96	34,12	32,53	23,97	15,60
18C Combinación media	13,4	20,1	11,9	9,1	8,3	8,4
19F Combinación media	57,5	90,0	63,8	36,5	47,0	69,1
23F Combinación media	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A GMC	0,06	0,09	0,25	0,08	0,23	0,19
IC	0,04-0,1	0,05-0,14	0,15-0,41	0,06-0,12	0,14-0,38	0,09-0,3
% sero	33 %	47 %	83 %	53 %	80 %	73 %
22F GMC	NR	5,81	3,76	0,54	0,85	2,02
IC		3,2-10,6	1,8-7,9	0,3-1,1	0,4-1,7	1,2-3,4
% sero	0 %	97 %	90 %	77 %	87 %	97 %
NR -sin resultado experimental determinado						

Procedimiento con OPA en ratón:

- Se calentaron muestras de suero durante 45 min a 56 °C para inactivar cualquier complemento endógeno restante.
- 5 Alícuotas de veinticinco microlitros cada muestra de suero diluida a 1:2 se diluyó en serie dos veces en 25 µl de tampón OPA (HBSS-FBS inactivado al 14,4 %) por pocillo de una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron 25 µl de una mezcla de células HL-60 activadas (1×10^7 células/ml), semilla de trabajo de neumococos recién descongelada y complemento de cría de conejo crecientes congelado en una proporción, por ejemplo, de 4/2/1 (v/v/v) a los sueros diluidos para producir un volumen final de 50 µl. La placa de ensayo se incubó durante 2 h a 37 °C con agitación orbital (210 rpm) para estimular el procedimiento fagocítico. La reacción se detuvo dejando la microplaca en hielo durante al menos 1 min. A continuación, una alícuota de 20 µl de cada pocillo de la placa se transfirió en el pocillo correspondiente de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos y se añadieron a cada pocillo 50 µl de caldo de cultivo de Todd-Hewitt - agar al 0,9 %. Después de un periodo de incubación de una noche a 37 °C y CO₂ al 5 %, se hizo el recuento de las colonias de neumococos que aparecían en el agar usando un sistema automatizado de análisis de imágenes (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se usaron ocho pocillos sin muestra de suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de CFU de los pocillos de control se determinó y se usó para el cálculo de la actividad de eliminación para cada muestra de suero. La titulación de OPA para las muestras de suero se determinó mediante la dilución recíproca de suelo capaz para facilitar una eliminación de un 50 % de los neumococos. La titulación opsonofagocítica se calculó usando un análisis de ajuste de curva de 4 parámetros.
- 10
- 15
- 20

Los resultados de los ensayos de opsonofagocitosis se muestran en las Figuras 13 y 14.

Ejemplo 9, Inmunogenicidad en ratones Balb/c jóvenes de conjugados de PS 13-valente que contienen 19A-

dPly y 22F-PhtD

Se inmunizaron grupos de 30 ratones Balb/c jóvenes (4 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de cualquiera de los conjugados de PS 11-valente o conjugados de PS 13-valente, ambos mezclados con el Adyuvante C (véase a continuación).

- 5 La formulación de vacuna 11-valente estaba formada por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT and PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 11 valente que se discute en la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados de PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la
- 10 Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 13 valente que se discute en la Tabla 2 [que usa 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4, el vehículo de neumolisina se detoxificó con tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se realizó con formaldehído (los procedimientos se describen en el documento de patente WO 04/81515). En los grupos 2 y 3, se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se usó una fusión de PhtD_E (el constructo VP147 del documento de patente WO 03/054007. En el grupo 6, se conjugó 19A con toxoide de difteria y 22F con proteína D.
- 15 Los niveles de IgG con ELISA anti-PS19A y 22F se dosificaron en sueros individuales recogidos el día 42. La respuesta de IgG con ELISA generada para el otro PS se midió en sueros combinados. Se mostró que 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna de conjugado 13-valente eran inmunogénicos en ratones Balb/c jóvenes (Tabla 16). La respuesta inmunitaria inducida frente al otro PS no
- 20 influía de forma negativa en ratones a los que se proporcionó la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Se realizó ELISA como se describe en el ejemplo 8.

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

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

(continuación)

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

Procedimiento con OPA en ratón:

- Se calentaron muestras de suero durante 45 min a 56 °C para inactivar cualquier complemento endógeno restante.
- 5 Alícuotas de veinticinco microlitros cada muestra de suero diluida a 1:2 se diluyó en serie dos veces en 25 µl de tampón OPA (HBSS-FBS inactivado al 14,4 %) por pocillo de una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron 25 µl de una mezcla de células HL-60 activadas (1×10^7 células/ml), semilla de trabajo de neumococos recién descongelada y complemento de cría de conejo crecientes congelado en una proporción, por ejemplo, de 4/2/1 (v/v/v) a los sueros diluidos para producir un volumen final de 50 µl. La placa de
- 10 ensayo se incubó durante 2 h a 37 °C con agitación orbital (210 rpm) para estimular el procedimiento fagocítico. La reacción se detuvo dejando la microplaca en hielo durante al menos 1 min. A continuación, una alícuota de 20 µl de cada pocillo de la placa se transfirió en el pocillo correspondiente de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos y se añadieron a cada pocillo 50 µl de caldo de cultivo de Todd-Hewitt - agar al 0,9 %. Después de un periodo de incubación de una noche a 37 °C y CO₂ al 5 %, se hizo el recuento de las colonias de neumococos que aparecían en el agar usando un sistema automatizado de análisis de imágenes (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se
- 15 usaron ocho pocillos sin muestra de suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de CFU de los pocillos de control se determinó y se usó para el cálculo de la actividad de eliminación para cada muestra de suero. La titulación de OPA para las muestras de suero se determinó mediante la dilución recíproca de suelo capaz para facilitar una eliminación de un 50 % de los neumococos. La titulación
- 20 opsonofagocítica se calculó usando un análisis de ajuste de curva de 4 parámetros.

Los resultados de los ensayos se muestran en las Figuras 15 y 16.

Resultados en formulaciones de alumbre:**Inmunogenicidad en ratones Balb/c jóvenes de conjugados de PS 13-valente que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD**

- 25 Se inmunizaron grupos de 40 ratones Balb/c jóvenes (4 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de cualquiera de los conjugados de PS 11-valente o conjugados de PS 13-valente, ambos adsorbidos en AIPO₄. Se coadministró Infanrix Hexa.
- La formulación de vacuna 11-valente estaba formada por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 11 valente que se discute en la Tabla 2). La
- 30 formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados de PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 13 valente que se discute en la Tabla 2 [que usa 22F conjugado

directamente)). En el grupo 2 y 4, el vehículo de neumolisina se detoxificó con tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se realizó con formaldehído. En los grupos 2 y 3, se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se usó una fusión de PhtD_E (el constructo VP147 del documento de patente WO 03/054007). En el grupo 6, se conjugó 19A con toxoide de difteria y 22F con proteína D.

Los niveles de IgG con ELISA anti-PS19A y 22F y las titulaciones de opsonofagocitosis se midieron en sueros individuales recogidos el día 42. La respuesta de IgG con ELISA generada para el otro PS se midió en sueros combinados.

Se mostró que 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna de conjugado 13-valente eran inmunogénicos e inducían titulaciones de opsonofagocitosis en ratones Balb/c jóvenes (Tabla 17 y figuras 19-20). La respuesta inmunitaria inducida frente al otro PS no influía de forma negativa en ratones a los que se proporcionó la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Se usaron ensayos de opsonofagocitosis para evaluar los sueros y los resultados se muestran en las Figuras 19 y 20.

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

ELISA POST-III	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD-E 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 1/10 HD SC	GRUPO 11V 19A-DT 22F-PD 1/10 HD SC
1 Combinación media	37,535	35,312	56,839	39,781	35,739,	30,270
3 Combinación media	9,093	9,874	7,991	10,548	7,502	8,217
4 Combinación media	28,422	27,439	25,796	31,274	34,295	31,589
5 Combinación media	9,256	8,668	9,6	7,551	8,869	8,309
6B Combinación media	0,552	0,423	0,565	0,264	0,263	0,435
7F Combinación media	3,771	2,541	5,394	2,618	2,754	3,048
9V Combinación media	23,447	23,479	27,394	19,072	24,282	28,017
14 Combinación media	25,921	26,103	24,927	16,487	20,517	24,795
18C Combinación media	6,223	6,873	7,726	5,812	9,186	9,146
19F Combinación media	61,271	70,498	88,336	73,879	96,521	66,484
23F Combinación media	1,836	0,669	0,648	0,259	1,116	0,596
19A GMC	0,065	1,797	2,256	1,950	2,128	3,640
95 % de IC	NT	1,206-2,678	1,71-2977	1,368-2,778	1,478-3,064	2,793-4,744
% seropos	65 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
22F GMC	0,05	0,171	0,097	9,924	8,837	11,993
95 % de IC	0,05-0,05	0,104-0,282	0,0690,141	7,19-13,695	5,692-13,719	9,079-15,842
% seropos	0 %	53 %	41 %	100 %	100 %	100 %

Inmunogenicidad en ratones OF1 jóvenes de conjugados de PS 13-valente que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD

Se inmunizaron grupos de 40 ratones OF1 jóvenes (4 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de cualquiera de conjugados de PS 11-valente o conjugados de PS 13-valente, ambos adsorbidos en AIPO4. Se coadministró Infanrix Hexa. La formulación de vacuna 11-valente estaba formada por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 11 valente que se discute en la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados de PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 13 valente que se discute en la Tabla 2 [que usa 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4, el vehículo de neumolisina se detoxificó con tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se realizó con formaldehído (los procedimientos se describen en el documento de patente WO 04/81515). En los grupos 2 y 3, se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se usó una fusión de PhtD_E (el constructo VP147 del documento de patente WO 03/054007. En el grupo 6, 19A se conjugó con toxoide de difteria y 22F con la proteína D.

Los niveles de IgG con ELISA anti-PS19A y 22F y las titulaciones de opsonofagocitosis se midieron en sueros individuales recogidos el día 42. La respuesta de IgG con ELISA generada para el otro PS se midió en sueros combinados.

Se mostró que 19A-dPly y 22F-PhtD administrados dentro de la formulación de vacuna de conjugado 13-valente eran inmunogénicos e inducían titulaciones de opsono-fagocitosis en ratones OF1 jóvenes (Tabla 18 y figuras 21-22). La respuesta inmunitaria inducida frente al otro PS no influía de forma negativa en ratones a los que se proporcionó la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Los sueros también se evaluaron mediante ensayo de opsono-fagocitosis y los resultados se muestran en las Figuras 21 y 22.

Tabla 18, Inmunogenicidad de PS en ratones OF1 jóvenes (niveles de IgG post-III)

ELISA POST-III	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD-E 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 1/10 HD SC	11V 19A-DT 22F-PD 1/10 HD SC
1 Combinación media	39,668	50,854	40,384	30,108	34,753	34,487
3 Combinación media	5,562	6,266	7,243	4,665	5,510	5,188
4 Combinación media	21,979	30,567	27,65	26,646	23,159	23,296
5 Combinación media	8,884	7,986	9,495	9,303	11,318	8,984
6B Combinación media	3,158	4,139	3,48	2,44	3,784	3,137
7F Combinación media	7,134	8,843	12,471	6,497	7,607	6,607
9V Combinación media	24,052	37,153	36,348	35,168	29,746	26,592
14 Combinación media	29,027	46,057	36,605	40,883	35,026	39,186
18C Combinación media	4,961	6,508	4,587	5,148	6,783	4,915
19F Combinación media'	48,667	74,366	45,561	63,845	68,155	47,703
23F Combinación media	0,664	1,093	0,996	0,212	0,764	1,579

(continuación)

ELISA POST-III	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD-E 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 1/10 HD SC	11V 19A-DT 22F-PD 1/10 HD SC
19A GMC	0,057	1,849	2,266	1,864	3,751	2,434
95 % de IC	NT	1,132-3,020	1,439-3,569	1,157-3,004	2,825-4,980	1,725-3,435
% seropos	48 %	100 %	98 %	95 %	100 %	100 %
22F GMC	0,064	11,190	16,196	12,431	17,319	27,490
95 % de IC	NT	6,225-20,114	9,718-26,992	7,95-19,439	12,056-24,879	22,044-34,281
% seropos	22,5 %	96,9 %	97,5 %	97,5 %	100,0 %	100,0 %

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

Se inmunizaron grupos de 20 cobayas jóvenes (Hartley Strain; 5 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 125 µl de cualquiera de conjugados de PS 11-valente o conjugados de PS 13-valente, ambos mezclados con el Adyuvante C (véase a continuación).

La formulación de vacuna 11-valente estaba formada por 0,25 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 11 valente que se discute en la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados de PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna 13 valente que se discute en la Tabla 2 [que usa 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4, el vehículo de neumolisina se detoxificó con tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se realizó con formaldehído. En los grupos 2 y 3, se usó PhtD para conjugar PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se usó una fusión de PhtD_E (el constructo VP147 del documento de patente WO 03/054007. En el grupo 6, se conjugó 19A con toxoide de difteria y 22F con proteína D.

Los niveles de IgG con ELISA anti-PS19A y 22F se evaluaron en sueros individuales recogidos el día 42 usando el siguiente protocolo.

La respuesta de IgG con ELISA generada para el otro PS se midió en sueros combinados.

Procedimientos de serología en cobaya:

Los niveles de IgG con ELISA anti-PS19A se evaluaron en sueros recogidos el día 42 usando el procedimiento que se describe aquí a continuación:

Las microplacas se revistieron durante 2 horas a 37 °C con el tipo 19A de PS de neumococos purificado (10 µg/ml) en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM - Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (V/V) en PBS Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se añadieron a los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de dos veces) en PBS-BSA al 0,05 % Tween al 0,05 %. Las placas se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como se ha mencionado anteriormente y se añadió un conjugado de peroxidasa de IgG anti-cobaya (diluido a 1/1000) y las placas se incubaron durante 30 minutos a TA. Después de lavado, el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M a pH 4,5 y 5 µl de H₂O₂) se añadió a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N. La absorbancia se leyó a 490-620 nm usando un espectrofotómetro. El color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

El nivel de la IgG anti-PS19A presente en los sueros desconocidos se determina por comparación con el suero de la curva de referencia añadido en cada placa y se expresa en µg/ml.

Los niveles de IgG con ELISA de anti-PS22F se dosificaron en sueros recogidos el día 42 usando el procedimiento que se describe aquí a continuación:

Las microplacas se revistieron durante 2 horas a 37 °C con el tipo 22F de PS de neumococos purificado (10 µg/ml) en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM - Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (V/V) en PBS Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se añadieron a los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de dos veces) en PBS-BSA al 0,05 % Tween al 0,05 %.

Las placas se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como se ha mencionado anteriormente y se añadió un conjugado de peroxidasa de IgG anti-cobaya (diluido a 1/1000) y las placas se incubaron durante 30 minutos a TA. Después de lavado, el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 a M pH 4,5 y se añadieron 5 µl de H₂O₂ a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N. La absorbancia se leyó a 490-620 nm usando un espectrofotómetro. El color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

El nivel de la IgG anti-PS22F presente en los sueros desconocidos se determina por comparación con el suero de la curva de referencia añadido en cada placa y se expresa en µg/ml

Las respuestas inmunitarias dirigidas frente a los otros serotipos se realizaron de acuerdo con los mismos procedimientos excepto en que los sueros de cobayas se combinaron.

Tabla 19, Inmunogenicidad de PS en Cobayas (niveles de IgG post-III)

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

(continuación)

Cobayas						
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V	11V 19A-dPly gmb 22F-PhtD	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD	11V 19A-dPly gmb 22F-PhtD-E	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E	11V 19A-DT 22F-PD
	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl
	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C
22F GMC	0,12	2,51	3,67	45,74	30,68	96,38
IC	0,09-0,16	0,94-6,73	1,59-8,42	29,3-71,4	17-53,3	73,5-126,4
% sero	10 %	95 %	95 %	100 %	100 %	100 %

También se usaron ensayos de opsonofagocitosis para someter a ensayo los sueros y los resultados se muestran en las Figuras 17 y 18.

5 Ejemplo 11: Formulaciones que se están realizando y sometiendo a ensayo

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

10

14V 25 µg de MPL Suma de contenido de BAC Aluminio -> FF Por Dosis:						14V 10 µg de MPL Suma de contenido de BAC Aluminio -> FF Por Dosis:					
PS	vehículo	µg PS	µg MPL	proporción de PS/Al 1/x	µg Al	PS	vehículo	µg PS	µg MPL	proporción de PS/Al 1/x	µg Al
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT _{AH}	3		15	45	18C	TT _{AH}	3		10	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30	22F	PhtD	3		10	30

(continuación)

14V 25 µg de MPL Suma de contenido de BAC Aluminio -> FF Por Dosis:						14V 10 µg de MPL Suma de contenido de BAC Aluminio -> FF Por Dosis:					
PS	vehículo	µg PS	µg MPL	proporción de PS/AI 1/x	µg AI	PS	vehículo	µg PS	µg MPL	proporción de PS/AI 1/x	µg AI
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC MPL.50/200			25	4	100	BAC MPL 50/200			10	4	40
Contenido de FF Aluminio				Suma =	355	Contenido de FF Aluminio				Suma =	295

b) La misma formulación de sacárido se usa como adyuvante con cada uno de los siguientes adyuvantes:

- En la tabla que sigue a continuación en el presente documento, se muestra la concentración de los componentes de la emulsión por 500 µl de dosis.

5

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

	Adyuvante A4	Adyuvante A5	Adyuvante A6	Adyuvante A7
Ingredientes	250 µl o/w	250 µl o/w	125 µl o/w	50 µl o/w
	emulsión	emulsión	emulsión	emulsión
alfa	11,88 mg	11,88 mg	5,94 mg	2,38 mg
Tocoferol				
Escualeno	10,7 mg	10,7 mg	5,35 mg	2,14 mg
Tween 80	4,85 mg	4,85 mg	2,43 mg	0,97 mg
3D-MPL	50 µg	25 µg	25 µg	10 µg

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

Composición del Adyuvante B1

10 Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

Liposomas:

- DOPC 1 mg
- colesterol 0,25 mg

15

3DMPL 50 µg
 QS21 50 µg
 KH₂PO₄ 1 3,124 mg de Tampón
 Na₂HPO₄ 1 0,290 mg de Tampón

NaCl 2,922 mg
(100 mM)
WFI c.s. ad 0,5 ml de Disolvente
pH 6,1
1. Concentración total de PO₄ = 50 mM

Composición de Adyuvante B2

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

Liposomas:

- DOPC 0,5 mg
- colesterol 0,125 mg

3DMPL 25 µg
QS21 25 µg
KH₂PO₄ 1 3,124 mg de Tampón
Na₂HPO₄ 1 0,290 mg de Tampón
NaCl 2,922 mg
(100 mM)
WFI c.s. ad 0,5 ml de Disolvente
pH 6,1

d) Los sacáridos también se formulan con Adyuvante C (véase anteriormente para otras composiciones en las que se ha usado este adyuvante):

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

Emulsión de aceite en agua: 50 µl

- escualeno 2,136 mg
- α-tocoferol 2,372 mg
- Tween 80 0,97 mg
- colesterol 0,1 mg

3DMPL 50 µg
QS21 50 µg
KH₂PO₄ 1 0,470 mg de Tampón
Na₂HPO₄ 1 0,219 mg de Tampón
NaCl 4,003 mg
(137 mM)
KCl 0,101 mg
(2,7 mM)
WFI c.s. ad 0,5 ml de Disolvente
pH 6,8

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

Se inmunizaron grupos de 30 ratones Balb/c hembra mediante la vía intramuscular (IM) los días 0, 14 y 28 con formulaciones de PS 13-valente que contienen los PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F (dosis: 0,3 µg de sacárido / conjugado para PS 4, 18C, 19A, 19F y 22F y 0,1 µg de sacárido / conjugado para el otro PS).

El PS 18C se conjugó con Toxoide del Tétanos, 19F con Toxoide de Difteria, 19A con Ply detoxificado con formol, 22F con PhtD y el otro PS con PD.

Se compararon dos formulaciones, formadas por cualquier 22F-PhtD fabricado mediante química directa de CDAP o 22F-AH-PhtD (PS derivatizado con ADH). Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para características de la vacuna 13 valente fabricada ya sea con 22F conjugado directamente o a través de un espaciador de ADH. Las formulaciones de vacuna se complementaron con adyuvante C.

Los niveles de IgG con ELISA anti-PS22F y las titulaciones de opsono-fagocitosis se midieron en sueros recogidos el día 42.

Se mostró que 22F-AH-PhtD era mucho más inmunogénico que 22F-PhtD en términos tanto de los niveles de IgG (figura 5) como de las titulaciones opsono-fagocíticas (figura 6).

Ejemplo 13, impacto de nuevos adyuvantes en la inmunogenicidad de conjugados de PS capsulares de

Streptococcus pneumoniae

Se inmunizaron grupos de 40 ratones C57B1 jóvenes mediante la vía IM los días 0, 14 y 28 con formulaciones de PS 13-valente que contienen los PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F (dosis: 0,3 µg / conjugado para los PS 4, 18C, 19A, 19F y 22F y 0,1 µg / conjugado para el otro PS).

- 5 PS 18C se conjugó con Toxoide del Tétanos, 19F con Toxoide de Difteria, 19A con Ply detoxificado con formol, 22F con PhtD y el otro PS con PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para características de la vacuna 13 valente fabricada con 22F conjugado directamente.

Se compararon cuatro formulaciones, complementadas con cualquiera de AlPO₄, adyuvante A1, adyuvante A4 o adyuvante A5.

- 10 Los niveles de IgG con ELISA anti-PS, Ply, PhtD y PD se midieron en sueros recogidos el día 42 y se combinaron por grupo. La siguiente proporción se calculó para cada antígeno: nivel de IgG inducido con el nuevo adyuvantes sometido a ensayo / nivel de IgG inducido con AlPO₄.

Todos los nuevos adyuvantes sometidos a ensayo aumentaron al menos 2 veces las respuestas inmunitarias a los conjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 22F en comparación con la formulación de AlPO₄ clásica (figura 7). No se obtuvo ninguna respuesta fiable para el serotipo 23F en este experimento.

- 15

Ejemplo 14, eficacia protectora de una combinación de PhtD/Ply detoxificado en un modelo de neumonía de mono por neumococos

Se inmunizaron grupos de 6 monos Rhesus (de 3 a 8 años de edad), seleccionados entre los que tienen los niveles de anticuerpo anti-19F existente previamente más bajos, por vía intramuscular los días 0 y 28 con cualquiera de conjugados de PS 11-valente (es decir, 1 µg de PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F, y 3 µg de PS 4, 18C y 19F [de sacarido]) o PhtD (10 µg) + Ply detoxificado con formol (10 µg) o proteína de fusión PhtD/E (10 µg) y Ply detoxificado con formol (10 µg) o el adyuvante solo.

- 20

PS 18C se conjugó con Toxoide del Tétanos, 19F con Toxoide de Difteria y el otro PS con PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para características de la vacuna 11 valente. Todas las formulaciones se complementaron con adyuvante C.

- 25

Se inocularon neumococos de tipo 19F (5.10⁸ cfu) en el pulmón derecho el día 42. Se hizo el recuento de las colonias en lavados bronco-alveolares recogidos los días 1, 3 y 7 después de la exposición inmunitaria. Los resultados se expresaron como el número de animales por grupo ya fuera muertos, colonizados en el pulmón, o eliminados el día 7 después de la exposición inmunitaria.

- 30 Como se muestra la figura 8, se obtuvo una buena protección cerca de la significancia estadística (a pesar del bajo número de animales usados) con conjugados de 11-valente y la combinación de PhtD+dPly (p < 0,12, ensayo Exacto de Fisher) en comparación con el grupo de adyuvante solo.

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

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

Los niveles de IgG con ELISA anti-PhtD se midieron en sueros recogidos el día 28.

- 40 Los ratones se sometieron a exposición inmunitaria por vía intra nasal con 5.10⁶ cfu de pneumococos de tipo 4 el día 29 (es decir, un serotipo de neumococos no cubierto potencialmente por el PS presente en la formulación de vacuna sometida a ensayo). La mortalidad inducida se controló hasta el día 10 después de la exposición inmunitaria.

Los resultados que se muestran en la figura 9 muestran que 22F-AH-PhtD inducía una respuesta a IgG anti-PhtD significativamente más elevada en comparación con 22F-PhtD. Esto se reflejaba en una protección mejor frente a la exposición inmunitaria de tipo 4 en comparación con 22F-PhtD como se muestra en la Figura 10.

- 45

Ejemplo 16, Beneficio de la combinación de polisacárido y proteína en la generación de una respuesta inmunitaria protectora.

La sinergia potencial entre respuestas inmunitarias dirigidas frente a PhtD y polisacáridos capsulares se evaluó en el modelo de exposición inmunitaria a *S. pneumoniae* letal de ratón. Los ratones inmunizaron por vía intramuscular tres veces (D0, 14 y 28) con PhtD. Una hora antes de la exposición inmunitaria bacteriana, anticuerpos anti-polisacáridos se transfirieron de forma pasiva a ratones (IP, 200 µl). La letalidad inducida por *S. pneumoniae* fue seguida de hasta 8 o 11 días después de la exposición inmunitaria. La sinergia de la protección se presenta aquí para dos cepas de *S.*

- 50

pneumoniae (serotipo 3 y serotipo 1).

Modelo de exposición inmunitaria al serotipo 3/43 de *S. pneumoniae*:

En este experimento, se inmunizaron ratones OF1 con PhtD adsorbido sobre AIPO4 y se transfirieron de forma pasiva 1,25 µg de anticuerpos de cobaya anti-PS3 1 hora antes de exposición inmunitaria con el serotipo 3 de *S. pneumoniae* (Spn 3/43).

Los resultados se muestran en la Figura 11. Se observó una letalidad de un 70 % en ratones que habían recibido solamente PBS. Se observó una protección moderada en el grupo de ratones que recibieron anticuerpos anti-PS3 o ratones inmunizados con PhtD. Se obtuvo una sinergia, que conduce a una protección casi completa, en ratones que combinaban inmunización activa y pasiva frente a PhtD y PS3, respectivamente.

Modelo de exposición inmunitaria al serotipo 1/57 de *S. pneumoniae*:

En este experimento, se inmunizaron ratones OF1 con PhtD usado como adyuvante con un adyuvante TH1 y los anticuerpos de cobaya anti-PS1 se transfirieron de forma pasiva una hora antes de la exposición inmunitaria con el serotipo 1 de *S. pneumoniae* (Spn 1/57).

Los resultados se muestran en la Figura 12. Se observó una letalidad elevada en el grupo de control en el que los ratones recibieron adyuvante TH1 (inmunización activa) y PBS solo (inmunización pasiva). Se observó una protección moderada en el grupo de ratones que recibieron anticuerpos anti-PS1 (supervivencia de un 55 %) o ratones inmunizados con PhtD (supervivencia de un 25 %). Se obtuvo una sinergia, que conduce a una protección casi completa, en ratones que combinaban inmunización activa y pasiva frente a PhtD y PS1, respectivamente.

Estos datos apoyan el efecto sinérgico de las respuestas inmunitarias dirigidas frente a proteína de neumococos (es decir, PhtD) y polisacáridos capsulares en el mecanismo de protección frente a infección por *S. pneumoniae*.

Ejemplo 17 Impacto de conjugados de PS-TT y PS-DT de neumococos en la respuestas inmunitarias dirigida frente a los conjugados restantes de PS-PD de neumococos en una formulación 11-valente.

Una formulación que contiene conjugados de 11 PS-PD se comparó con una formulación que contiene conjugados de 7 PS-PD, 2 PS-TT (PS 6B y 23F) y 2 PS-DT (PS 18C y 19F) en modelos de inmunogenicidad tanto de ratón como de cobaya.

Los ratones se inmunizaron por vía intramuscular tres veces con 1/10 de una dosis humana de las vacunas (0,1 µg de PS). Las muestras de sangre se recogieron el día 42 y la respuesta inmunitaria dirigida frente a cada polisacárido se midió con ELISA.

Los cobayas se inmunizaron por vía intramuscular tres veces con 1/4 de una dosis humana de las vacunas (0,25 µg de PS). Se coadministró Infanrix Hexa con el fin de imitar la situación humana. Las muestras de sangre se recogieron el día 42 y la respuesta inmunitaria dirigida frente a cada polisacárido se midió con ELISA.

Experimento N° SPN115 (pims 20040304) Ratón			Experimento N° Span116 (pims 20040308) , haya		
ELISA			ELISA		
	Todo en PD 1 µg	6B-TTAAH 1 µg 23F-TTAAH 1 µg 18C-DTAAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros en PD 1 µg		Todo en PD 1 µg	6B-TTAAH 1 µg 23F-TTAAH 1 µg 18C-DTAAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros en PD 1 µg
1 GMC	6,148	19.961*	1 GMC	8,244	33,479*
95 % CI	4,54-8,33	14,73-27,05	95 % CI	4,745 - 14,324	21,507,-52,114
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
3 GMC	1,763	2,483	3 GMC	2,348	1,619
95 % CI	1,223 - 2,542	1,693 - 3,643	95 % CI	1,42 - 3,89	0,84-3,13

(continuación)

Experimento N° SPN115 (pims 20040304) Ratón			Experimento N° Span116 (pims 20040308) , haya		
ELISA			ELISA		
	Todo en PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros en PD 1 µg		Todo en PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros en PD 1 µg
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
4 GMC	3,643	11,849*	4 GMC	9,211	19,033
95 % CI	2,498 - 5,311	8,909 -15,759	95 % CI	5,535-15,238	10,816 - 33,494
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
5 GMC	2,291	5,154*	5 GMC	14,04	14,791
95 % CI	1,575 - 3,332	3,829 - 6,939	95 % CI	9,967 - 19,776	10,227-21,392
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
6B GMC	0,048	0,537*	6B GMC	0,491	1,667
95 % CI	0,031 - 0,075	0,342 - 0,843	95 % CI	0,292,- 0,825	0,746 - 3,726
% seropos	44 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
7F GMC	0,297	0,774	7F GMC	10,467	37,49*
95 % CI	0,22-0,41	0,48-1,25	95 % CI	5,979 - 18,324	21,944 - 64,051
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
9V GMC	2,098	8,098*	9V GMC	5,459	10,309
95 % CI	1,575-2,793	6,507-10,078	95 % CI	3,106 - 9589	6,183- 17,187
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
14 GMC	4,983	9,327*	14 GMC	1,235	4,358*
95 % CI	3,742-6,634	7,669-11,3444	95 % CI	0,686-2,224	2,073-9,161
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
18C GMC	0,469	3,274*	19F GMC	7,769	
95 % CI	0,32-0,69	2,67-4,01	95 % CI	5,617-10,745	12,036-21,092
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %

(continuación)

Experimento N° SPN115 (pims 20040304) Ratón			Experimento N° Span116 (pims 20040308) , haya		
ELISA			ELISA		
	Todo en PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros en PD 1 µg		Todo en PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros en PD 1 µg
19F GMC	3,052	21,274*	18C GMC	2,373	8,744*
95 % CI	2,14-4,35	16,54-27,37	95 % CI	1,297 - 4,341	5,128- 14,908
% seropos	100 %	100 %	% seropos	100 %	100 %
23F GMC	0,072	1,209	23F GMC	5,621	33,791*
95 % CI	0,044 - 0,117	0,457 - 3,2	95 % CI	3,289 - 9,608	20,838 - 54,797
% seropos	38 %	71 %	% seropos	100 %	100 %

Un aumento de la respuestas inmunitarias dirigida frente a la mayor parte del polisacárido conjugado con PD se observó tanto en ratones como en cobayas en la formulación que contiene dos polisacáridos conjugados con TT (PS 6B y 23F) y DT (PS 18C y 19F) cuando se compara con la formulación de 11-V PD. Estas diferencias eran estadísticamente significativas frente a los PS 1, 4, 5, 9V y 14 así como frente a los PS 1, 7F y 14 en ratones y cobayas, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica de *Streptococcus pneumoniae* que comprende 12, o más sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con 2 o más proteínas vehículo diferentes, en la que la composición comprende sacárido capsular del serotipo 19F conjugado con toxoide de difteria (DT) o CRM197 y 2-8 de los sacáridos capsulares seleccionados entre diferentes serotipos conjugados con proteína D y en la que una mitad o una minoría de los conjugados de sacárido capsular contienen proteína D como proteína vehículo.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 en la que 19F es el único sacárido en la composición conjugado con toxoide de difteria (DT).
3. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la que 3, 4 o 5 de los sacáridos capsulares se conjugan con la proteína D.
4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que un sacárido de serotipo 4 se conjugua con la proteína D.
5. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la que un sacárido de serotipo 5 se conjugua con la proteína D.
6. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la que un sacárido de serotipo 7F se conjugua con la proteína D.
7. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la que un sacárido de serotipo 9V se conjugua con la proteína D.
8. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en la que un sacárido de serotipo 14 se conjugua con la proteína D.
9. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la que un sacárido de serotipo 22F se conjugua con la proteína D.
10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la que un sacárido de serotipo 23F se conjugua con la proteína D.
11. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende 2, 3, 4, 5 o 6 proteínas vehículo diferentes.
12. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que cada sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* se conjugua con una proteína vehículo seleccionada independientemente entre el grupo que consiste en: toxoide del tétanos (TT), toxoide de difteria (DT), CRM197, fragmento C de toxoide del tétanos, PhtD, fusiones de PhtDE, neumolisina detoxificada (dPly), y proteína D de *Haemophilus influenzae*.
13. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente una o más proteínas de *S. pneumoniae* sin conjuguar o conjugadas.
14. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Un procedimiento de fabricación de la vacuna de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. Un uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1 a 13 o vacuna de la reivindicación 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección por *Streptococcus pneumoniae*.
17. Un uso de acuerdo con la reivindicación 16 en el que la enfermedad es cualquiera o ambas de neumonía o enfermedad neumocócica invasiva (IPD) de ancianos, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en ancianos, meningitis y/o bacteremia de niños, otitis media de niños o neumonía y/o conjuntivitis de niños.

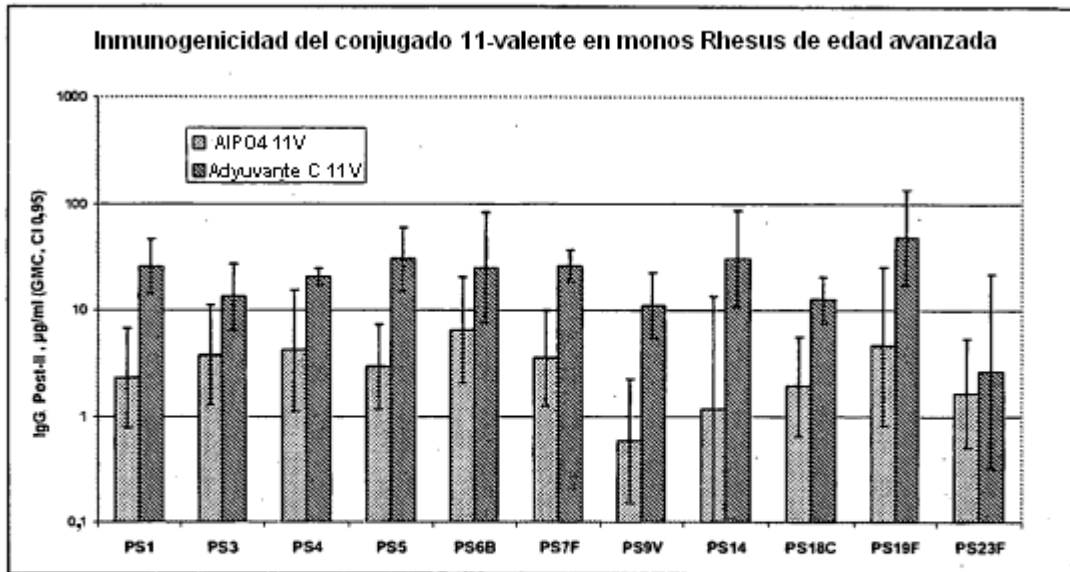


Figura 1

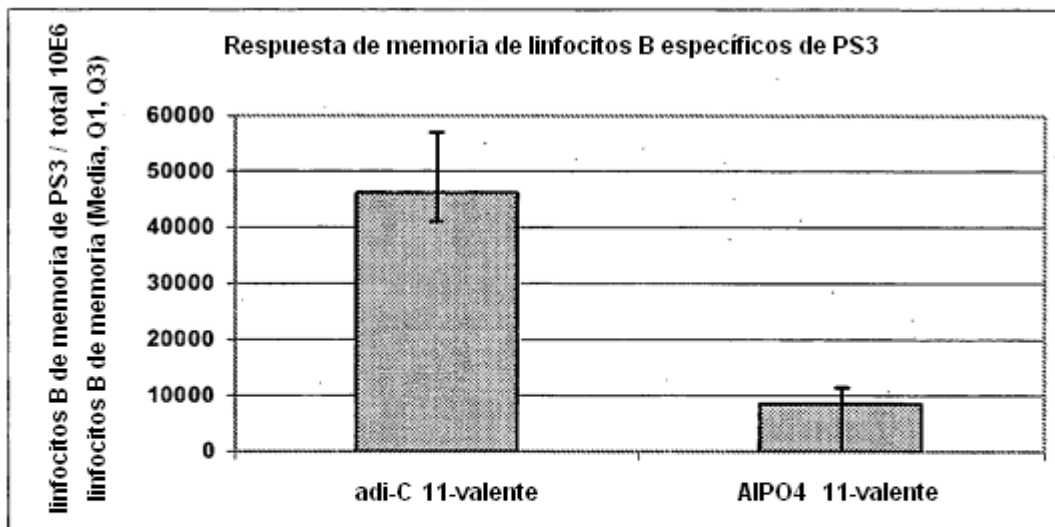


Figura 2

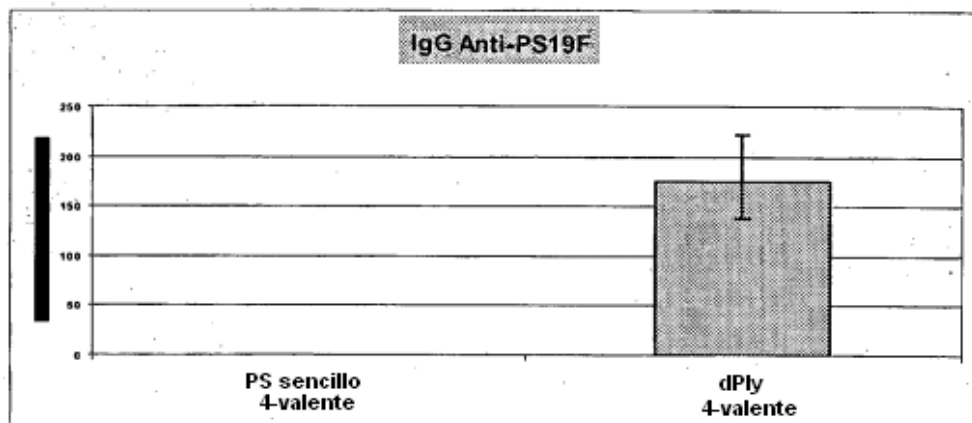


Figura 3

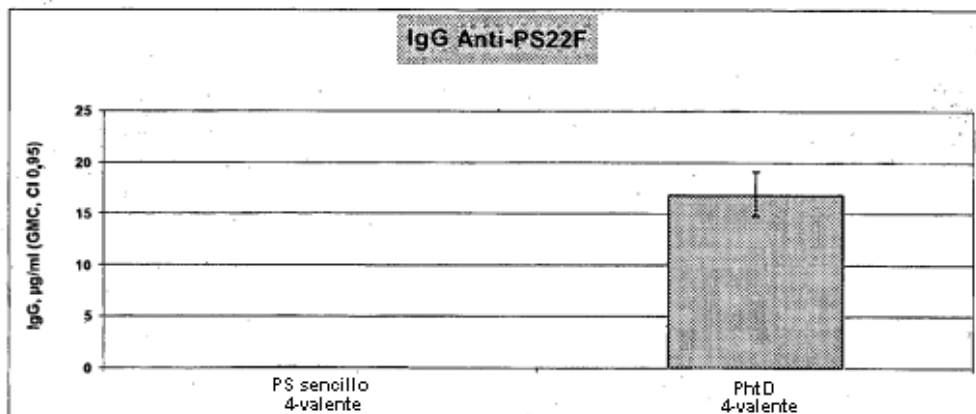


Figura 4

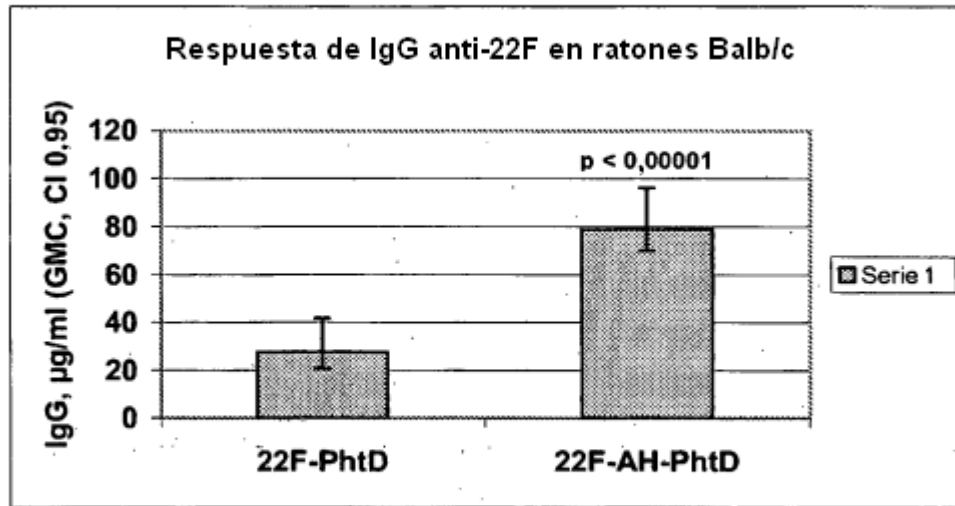


Figura 5

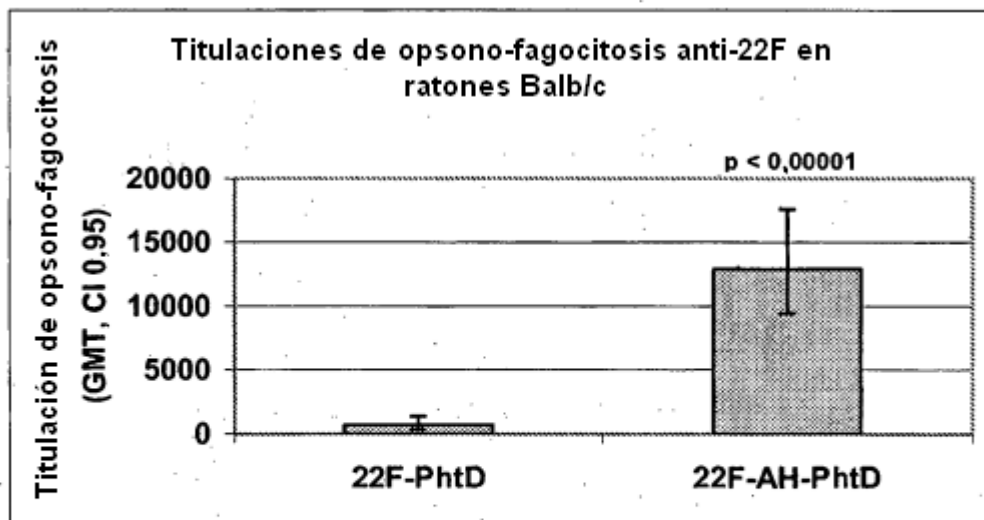


Figura 6

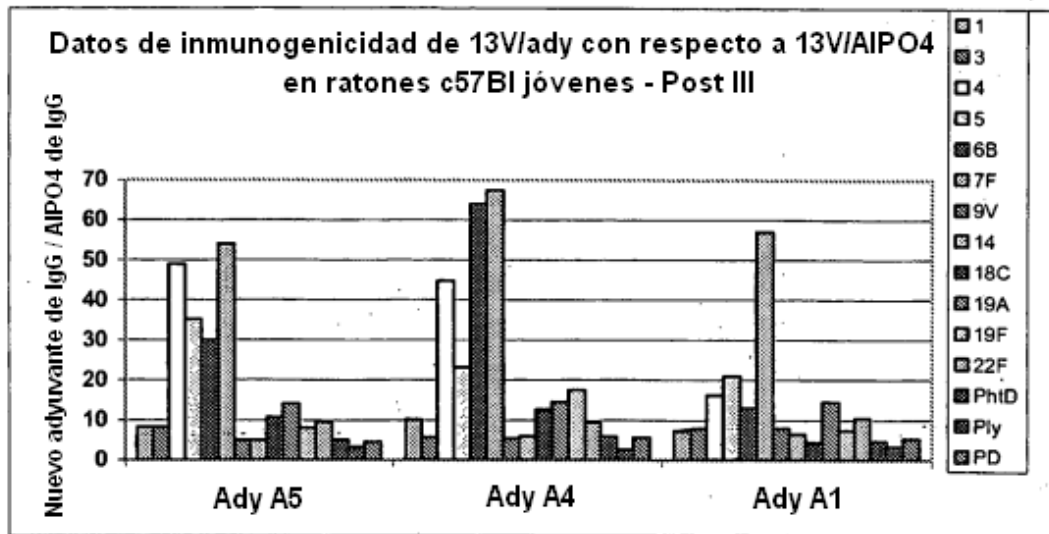


Figura 7

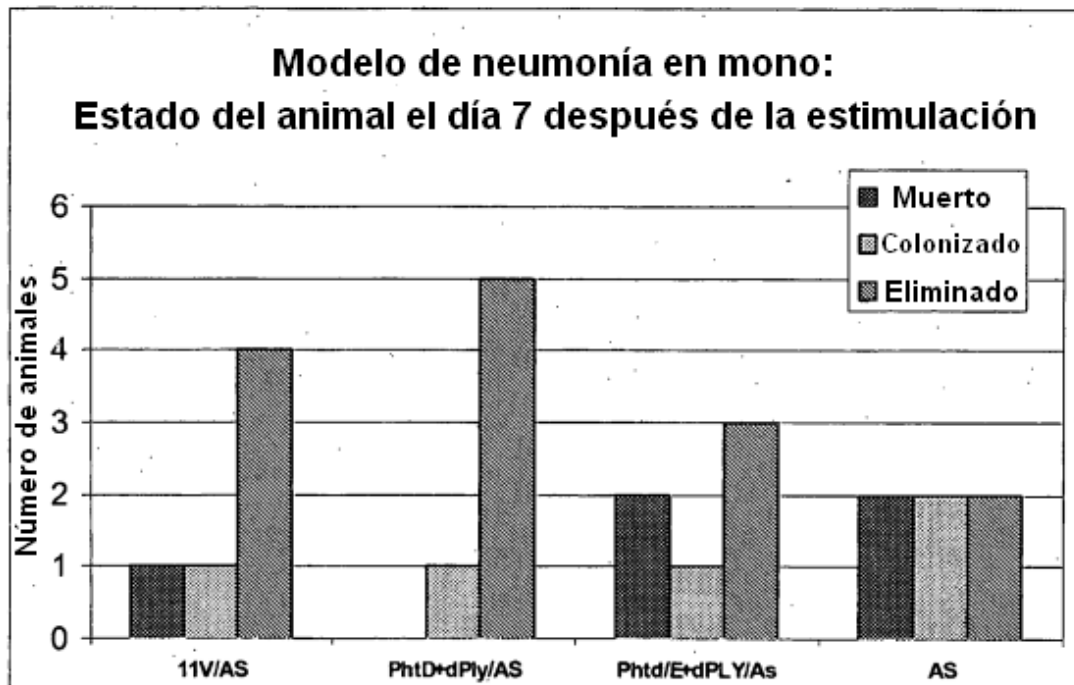


Figura 8

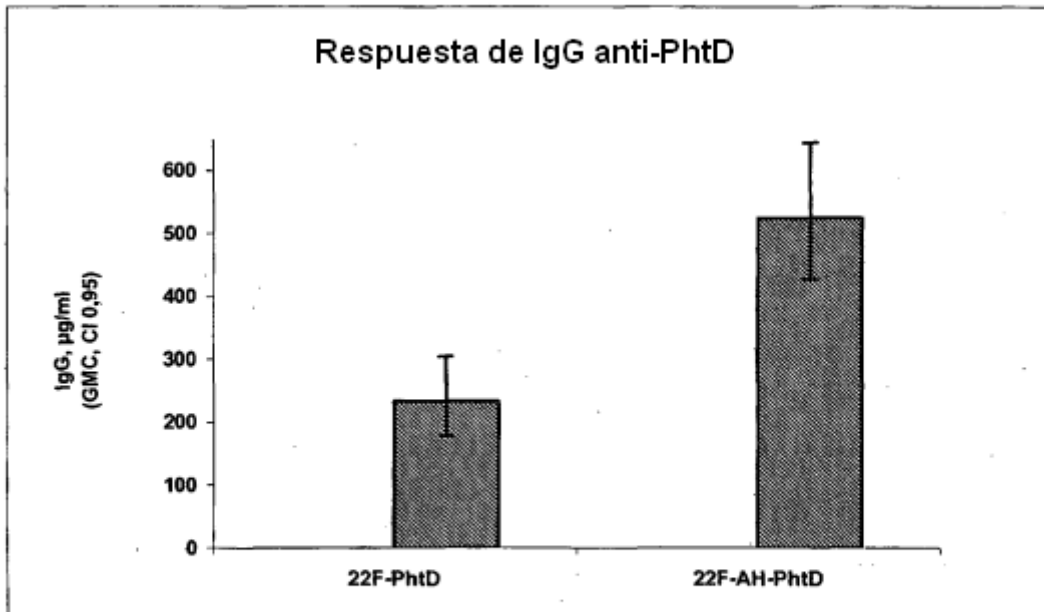


Figura 9

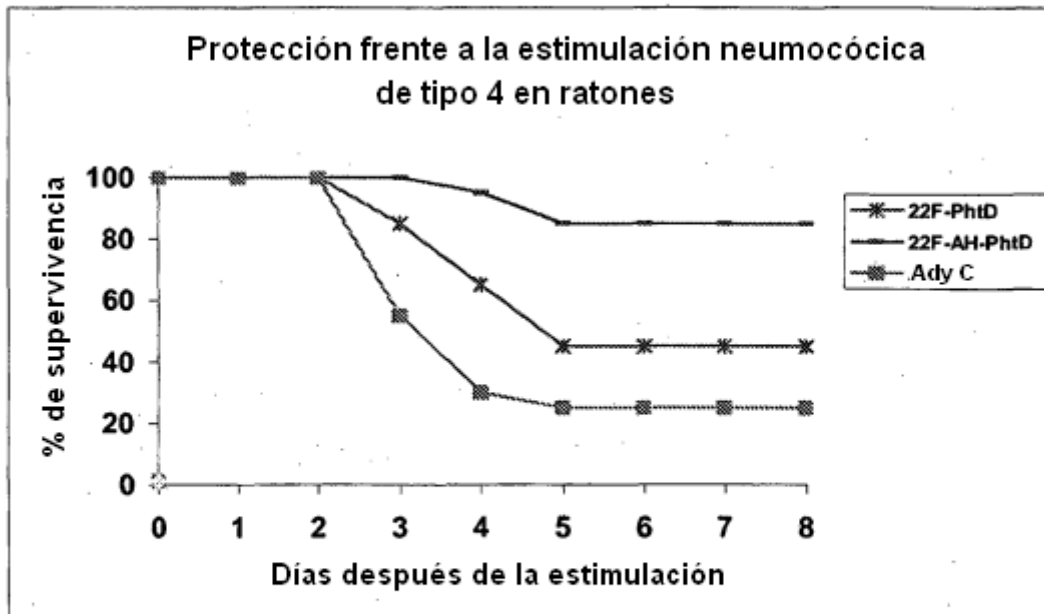


Figura 10

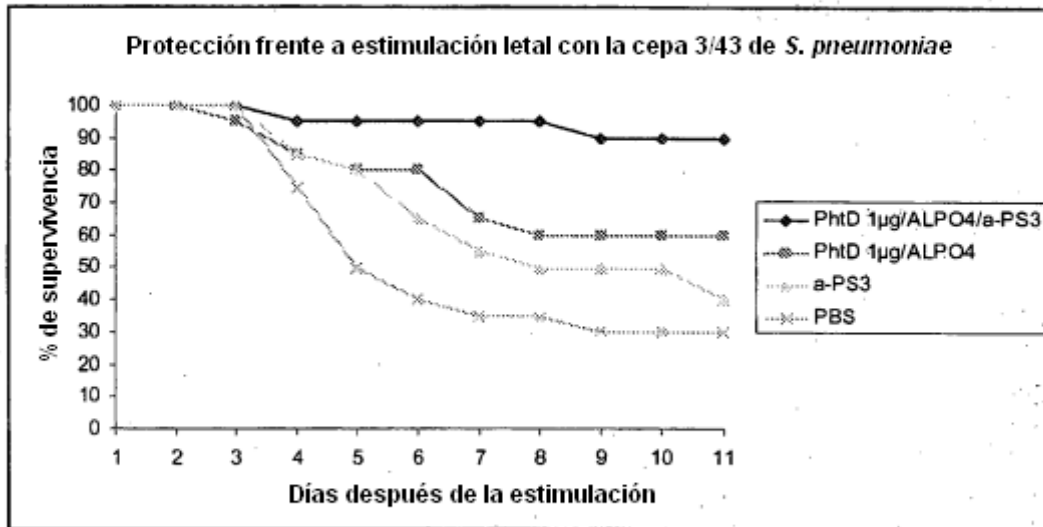


Figura 11

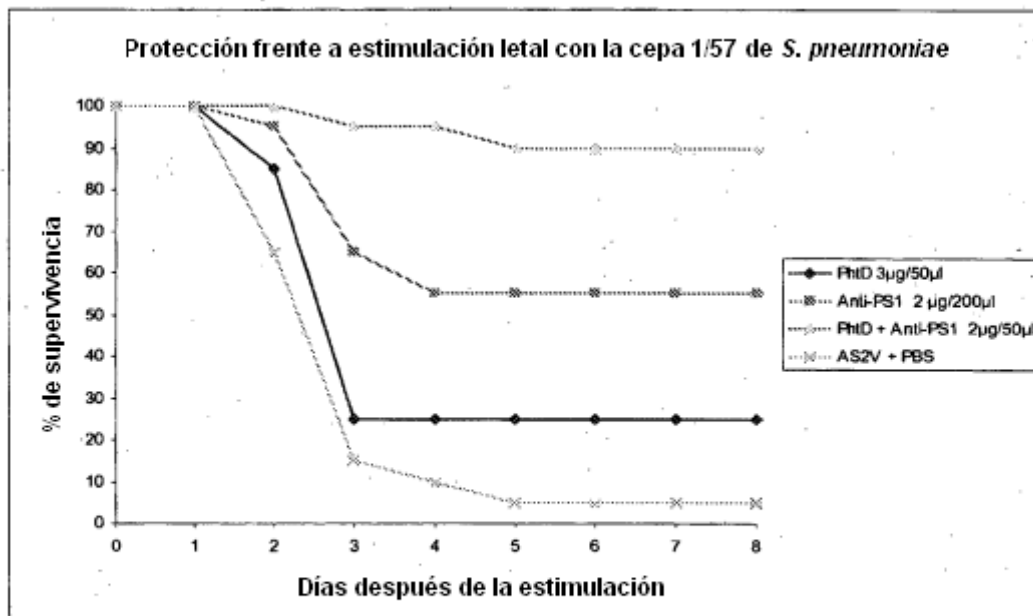


Figura 12

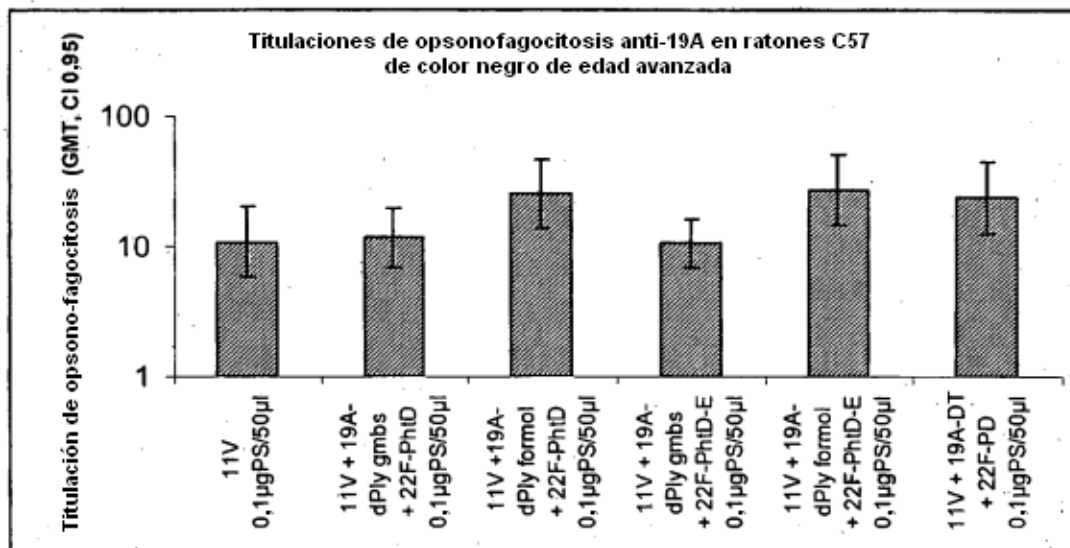


Figura 13

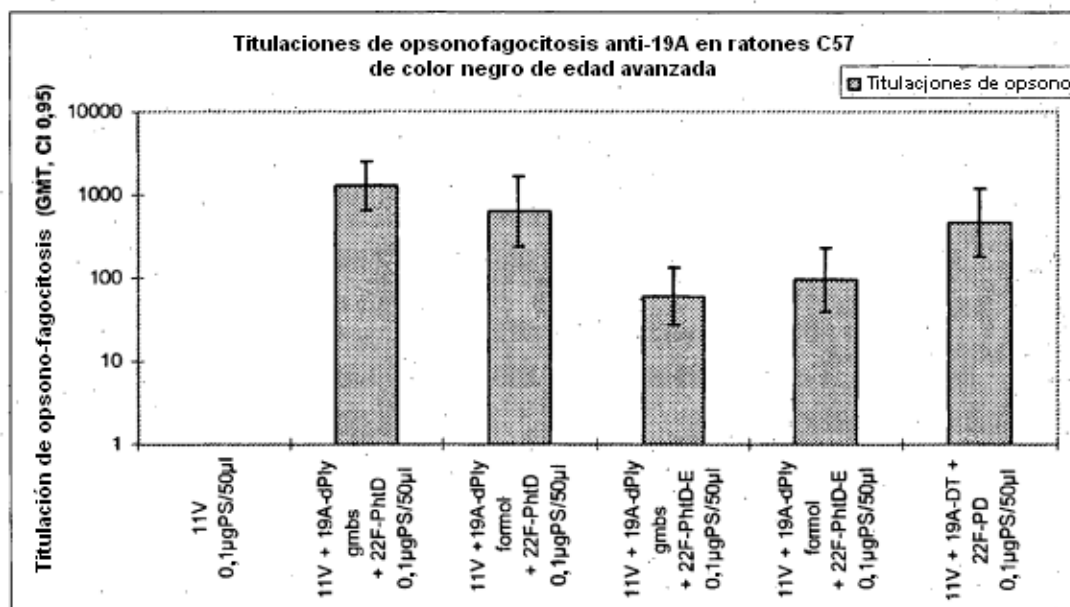
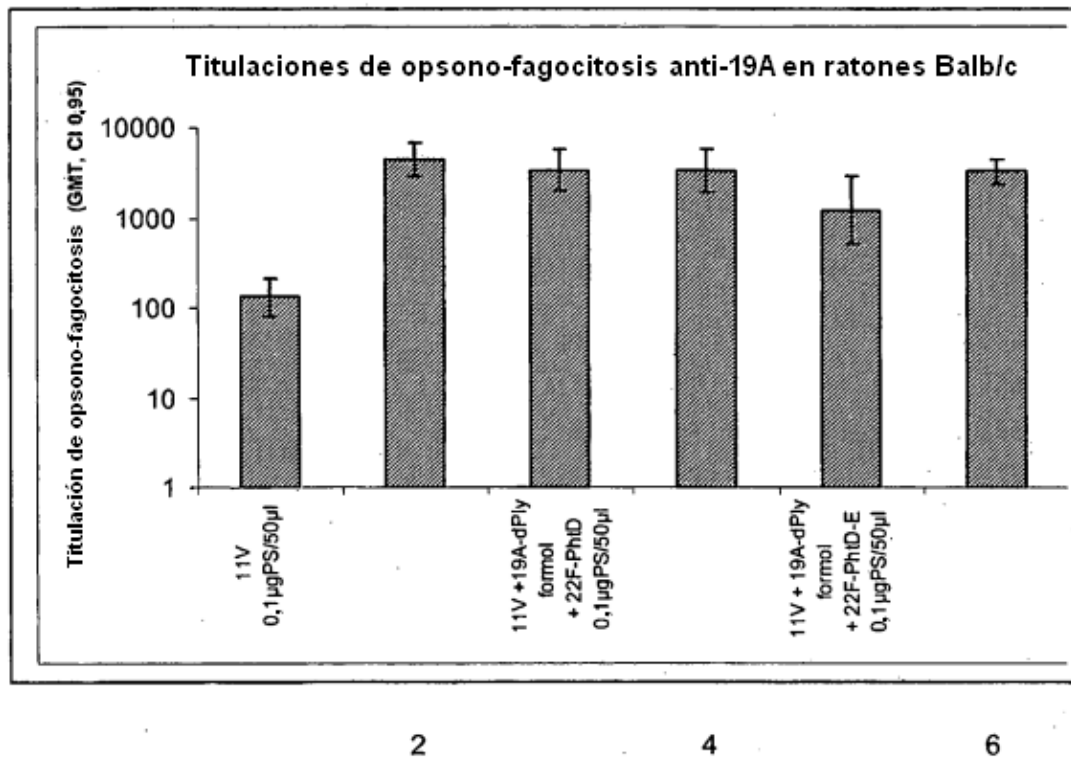
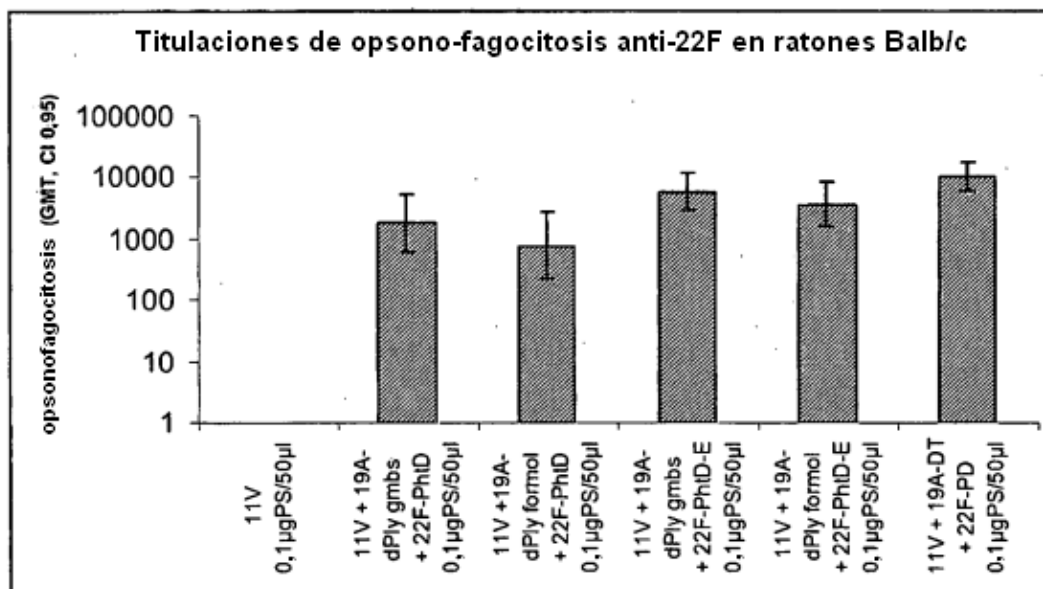


Figura 14

**Figura 15****Figura 16**

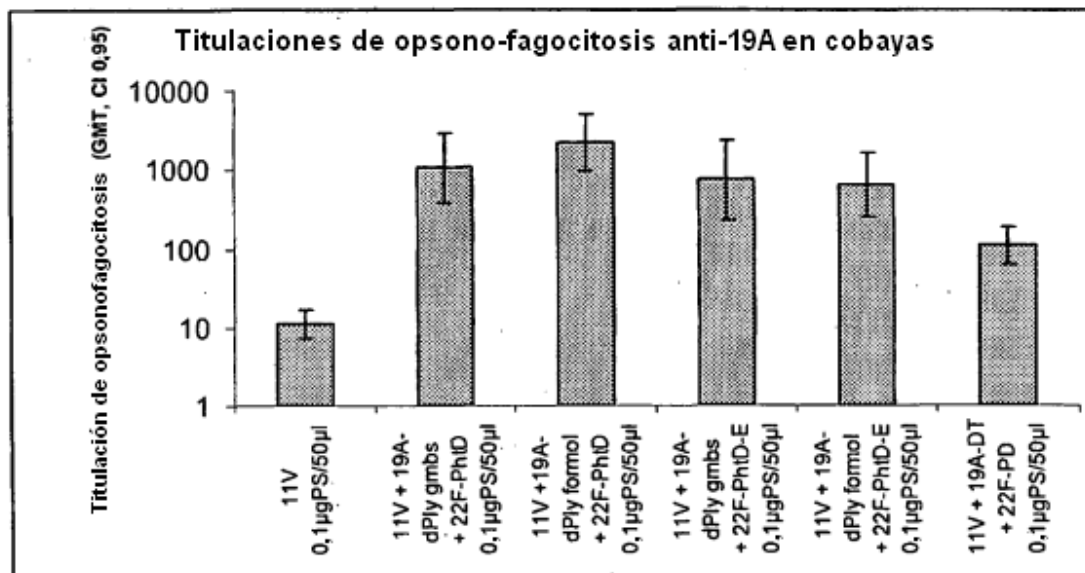


Figura 17

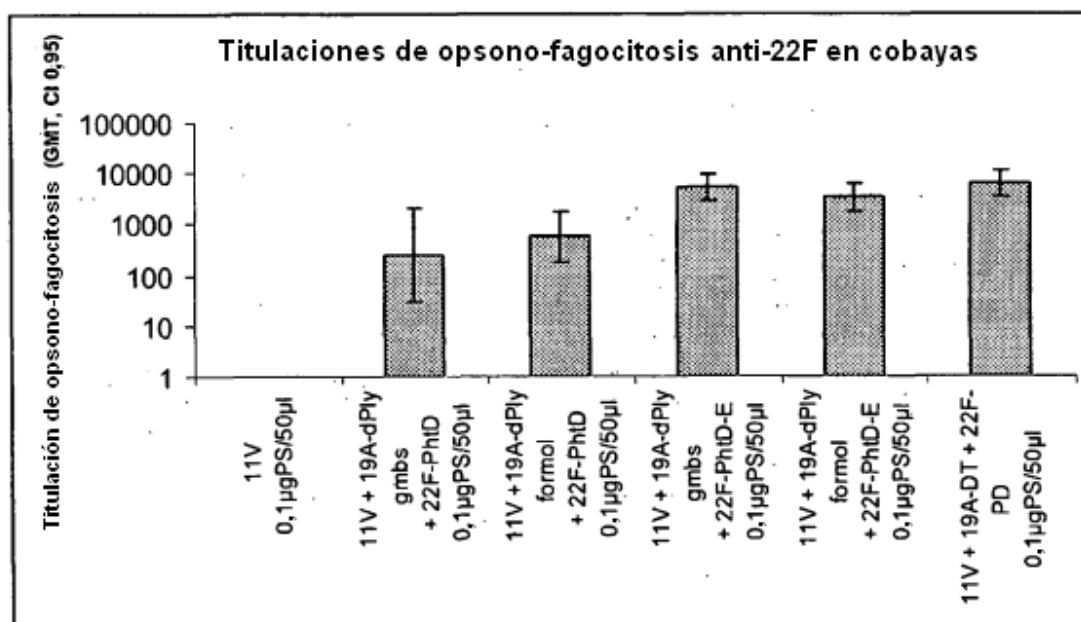


Figura 18

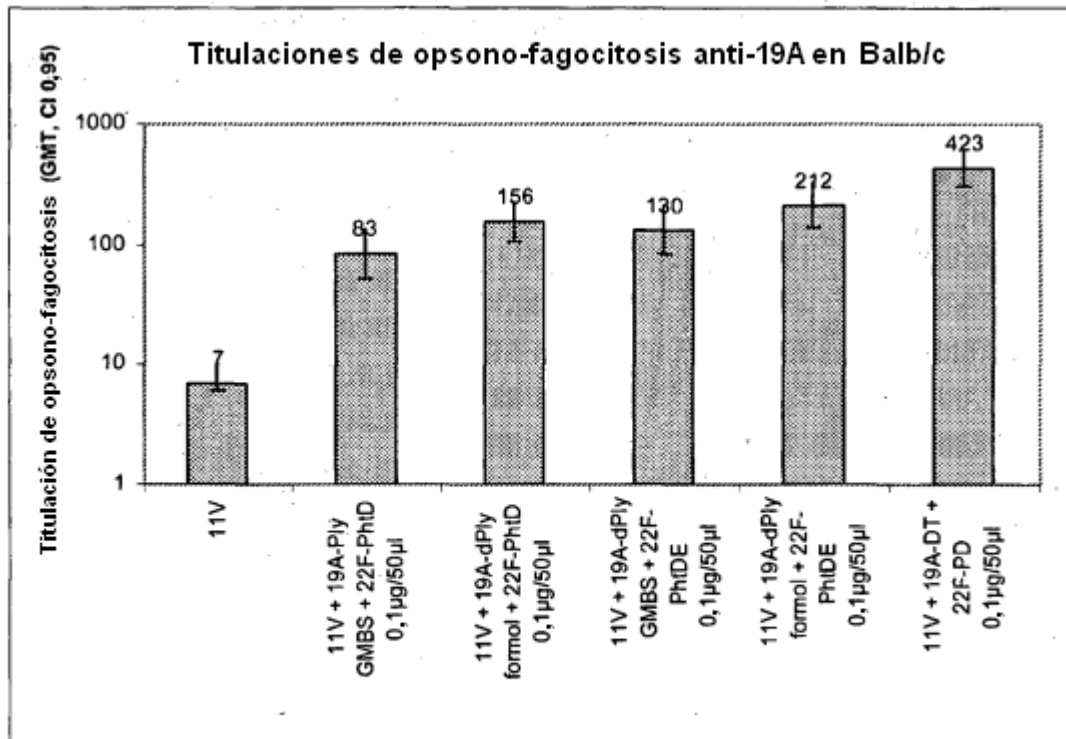


Figura 19

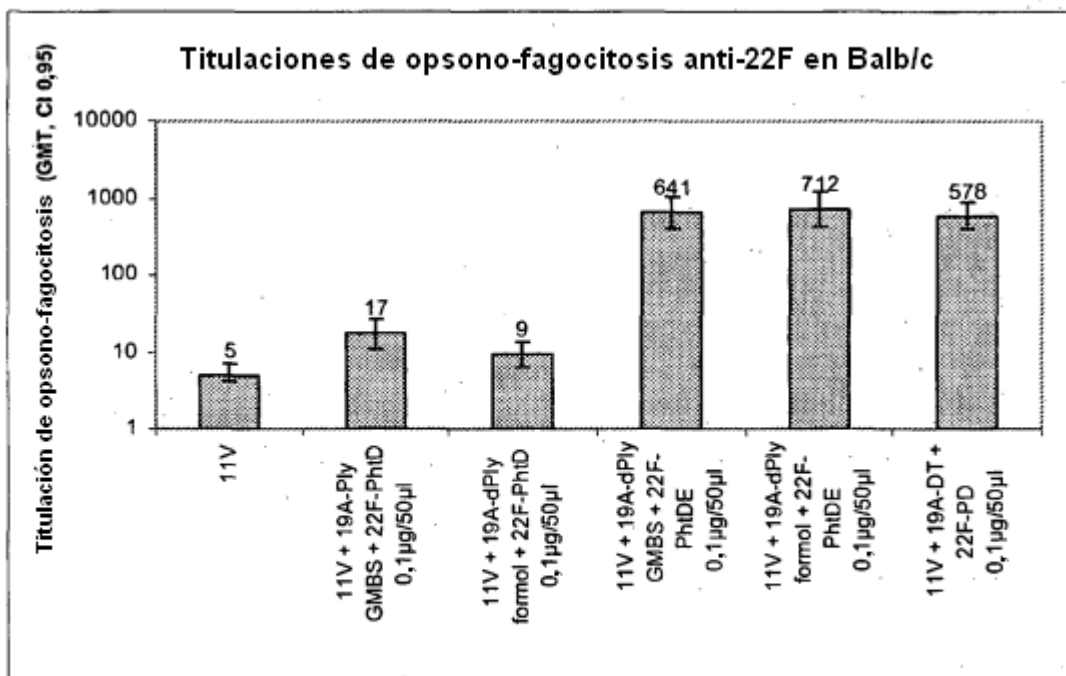


Figura 20

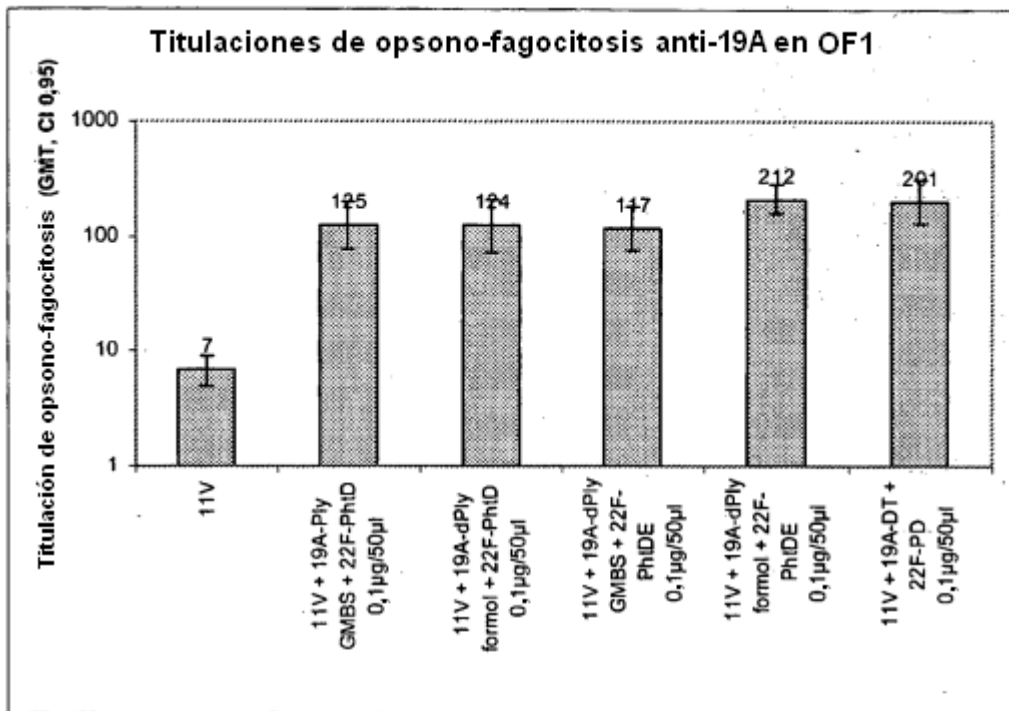


Figura 21

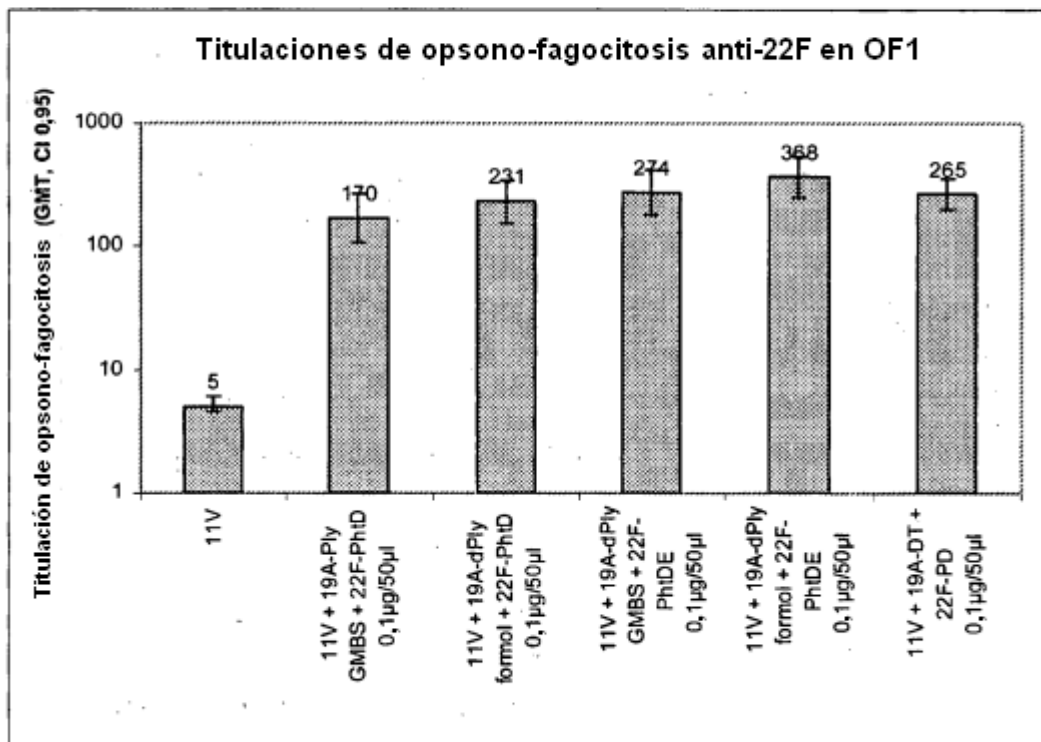


Figura 22